

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento

Raquel da Silva Aragão

Tratamento neonatal com agonista 5-HT_{1A}: repercussões sobre o
desenvolvimento da atividade locomotora em ratos

Recife
2009

Raquel da Silva Aragão

Tratamento neonatal com agonista 5-HT_{1A}: repercussões sobre o
desenvolvimento da atividade locomotora em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e
Ciências do Comportamento do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal
de Pernambuco, para obtenção do título de
Mestre em Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Raul Manhães de
Castro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Mônica
Ferraz Teixeira Lambertz

Recife

2009

Aragão, Raquel da Silva

Tratamento neonatal com agonista 5-HT_{1A}:
repercussões sobre o desenvolvimento da atividade
locomotora em ratos / Raquel da Silva Aragão. – Recife:
O Autor, 2009.

78 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Atividade locomotora. 2. Agonista 5-HT_{1A} –
Influência na locomoção. I. Título.

612.7
612.76

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-044

Raquel da Silva Aragão

Tratamento neonatal com agonista 5-HT_{1A}: repercussões sobre o
desenvolvimento da atividade locomotora em ratos

Dissertação aprovada em 20 de Fevereiro de 2009

Prof^a. Dr^a. Karla Mônica Ferraz Teixeira Lambertz

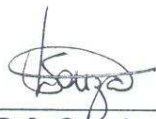
APROVADA

Prof^a. Dr^a. Ana Elisa Toscano

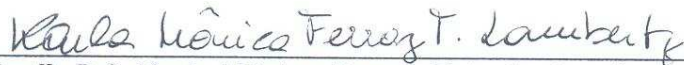
APROVADA

Prof^a. Dr^a. Sandra Lopes de Souza

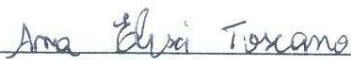
APROVADA



Prof^a. Dr^a. Sandra Lopes de Souza
Presidente da Banca Examinadora



Prof^a. Dr^a. Karla Mônica Ferraz Teixeira Lambertz



Prof^a. Dr^a. Ana Elisa Toscano

Recife

2009

À Ana, Adalberto e Antônio Rafael,
minha família amada.

Agradecimentos

A **minha família** pela compreensão e apoio durante todo esse período.

Ao meu orientador, **Raul Manhães de Castro**, por acreditar no potencial que nem eu mesma sabia que possuía. Por todas as orientações e desorientações. Por mostrar caminhos e me possibilitar escolhas. Por me deixar acertar, mas, principalmente, por me deixar errar e me permitir crescer.

A minha orientadora, **Karla Mônica Lambertz**, pelo exemplo de professora, fisioterapeuta, pesquisadora e por ter sempre se disposto a me ajudar.

Aos meus queridos amigos e companheiros de mestrado, **Kelli Ferraz e Rodrigo Fragoso**, por todos os momentos compartilhados, pelas palavras de força e carinho, e por, simplesmente, estarem lá quando precisei. Esta jornada foi mais fácil e alegre por conta de vocês.

Aos meus estagiários, **José Cândido, Patrícia e Ísis**, por toda dedicação e carinho que tiveram para com esta dissertação e comigo. Esse trabalho também é de vocês.

Aos professores **Sandra Lopes, Carol Leandro, Sebastião Rogério, Wylla Tatiane, Ana Elisa**, pelo exemplo de pesquisadores e pelas orientações que me deram na realização deste trabalho.

A minha querida prima **Thaysa, Sônia Marinho, Roberta Leite, José Antônio, Taciana Coutinho, Marco Fidalgo, Matilde, Luciene, Graça Paiva, Bruninho**, e todos aqueles que fazem parte da **Família NNI**, pelo apoio, carinho e atenção. Vocês tornaram essa jornada mais fácil e agradável.

Ao professor **Marco Benedetti, Carlos Henrique e Nicole**, por todo o trabalho no desenvolvimento do software.

A **Lúcia Pires, Daniel Lambertz** e professor **Eulálio Cabral**, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao veterinário **Dr. França**, pela ajuda no manuseio dos animais.

Aos **colegas do Mestrado em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento**, por todos os momentos que compartilhamos.

À **Coordenação da Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento** e às secretárias **Solange e Fátima**, pela dedicação e suporte aos pós-graduandos.

À **Pró-reitoria de Assuntos de Pesquisa e Pós-graduação** pela concessão da bolsa de estudo.

A **todos** que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu **MUITO OBRIGADA**.

E por tudo, e principalmente, por ter colocado vocês em minha vida, agradeço a **Deus**.

Resumo

A locomoção é uma importante função para os seres vivos. Alterações ambientais que ocorram durante o período crítico do desenvolvimento podem promover mudanças no desenvolvimento da atividade locomotora, trazendo prejuízos para o indivíduo. Trabalhos que utilizam a análise automática de comportamentos são de grande importância para o estudo da locomoção. Dentre os sistemas que podem influenciar o desenvolvimento da atividade locomotora, encontra-se o sistema serotoninérgico. Sugere-se que sua atuação seja intermediada via receptores 5-HT_{1A}. Esta dissertação teve como objetivo estudar as repercussões da manipulação farmacológica, crônica ou aguda, com agonista parcial 5-HT_{1A}, sobre a atividade locomotora em ratos. No primeiro estudo, foi desenvolvido um sistema automático de análise da atividade locomotora de pequenos animais, avaliados em um campo aberto. Este sistema permite estudar a atividade locomotora e evidenciar se estimulações ambientais adversas podem promover alterações no padrão de locomoção. Deste sistema, são extraídos parâmetros de distância percorrida, velocidade média, potência média, tempo de imobilidade, número de paradas, tempo de permanência nas áreas do campo e relação tempo de imobilidade/número de parada. Sua validação ocorreu a partir a análise do desenvolvimento da locomoção em ratos normais. Foram utilizados 19 ratos *Wistar* machos, avaliados no 8º, 14º, 17º, 21º, 30º e 60º dia pós-natal, durante 2 minutos. O sistema mostrou-se capaz de extrair eficazmente os parâmetros desejados. Dessa forma, foi possível observar modificações no padrão de locomoção dos animais, devido ao seu desenvolvimento. No segundo estudo, bupirona foi administrada cronicamente, 1º ao 21º dia de vida pós-natal, via subcutânea, nas doses de 2,5 (n=13), 5 (n=13) e 10 (n=13) mg/Kg, em ratos. Nos animais controle, foi administrada salina (n=14). Foram utilizados 53 ratos *Wistar* machos. O sistema utilizado, as idades e parâmetros avaliados foram os mesmos do primeiro estudo. O tratamento neonatal reduziu a potência média, aos 60 dias, em todas as doses utilizadas. Também alterou a evolução da característica de número de paradas e relação tempo de imobilidade/número de parada, nas doses mais baixas, durante o desenvolvimento. Nos mesmos animais, submetidos à manipulação neonatal, foi realizada aplicação aguda de bupirona (5mg/Kg), aos 70 dias, e, 30 minutos após a administração, a locomoção avaliada durante 10 minutos. Em todos os animais, ocorreu diminuição da atividade locomotora, indicando um possível efeito sedativo da droga. Notavelmente, observou-se redução da distância percorrida e do número de paradas, e aumento no tempo de imobilidade. Entretanto, o grupo que recebeu a dose mais alta de bupirona durante o aleitamento, a redução da distância percorrida foi menor. Em resumo, a manipulação neonatal com bupirona altera alguns parâmetros da atividade locomotora. A administração aguda de bupirona ocasiona redução da locomoção. Porém, em menor intensidade nos animais tratados com a maior dose do fármaco, durante o aleitamento, sugerindo ocorrência do fenômeno da programação.

Palavras-chaves: Atividade locomotora, análise automática da locomoção, desenvolvimento, programação, serotonina, bupirona, campo aberto, ratos.

Abstract

Locomotion is an important function to living beings. Environmental changes that occur during the critical period of development can promote changes in the development of locomotor activity, bringing impairment for the individual. Works using automatic analysis of behavior are of great importance for the study of locomotion. Among the systems that can influence the development of locomotor activity is serotonergic system. It is suggested that its action is mediated via 5-HT_{1A} receptors. This thesis aimed to study the effects of pharmacological manipulation, chronic or acute, with 5-HT_{1A} partial agonist, on locomotor activity, in rats. In the first study, we developed an automated system for the analysis of locomotor activity of small animals, subjected to an open field. This system allows the study of locomotor activity verifying if adverse environmental stimuli may alter locomotor pattern. Covered distance, average velocity, average potency, immobility time, number of stops, time the rat spent in the different areas of the open field and immobility time/number of stops relationship were the studied parameters. Validation of this system occurred by the analysis of the locomotor development in normal rats. 19 male *Wistar* rats were used, and studied at the 8th, 14th, 17th, 21st, 30th and 60th postnatal days, during 2 minutes. The system proved to be able to effectively extract the desired parameters. Thus it was possible to observe changes in the pattern of locomotion of animals, due to its development. In the second study, buspirone was administered chronically, from the 1st to the 21st postnatal day, subcutaneously, in doses of 2.5 (n = 13), 5 (n = 13) and 10 (n = 13) mg/Kg, in rats. In control animals was administered saline (n = 14). 53 male *Wistar* rats were used. System used, ages and parameter evaluated were the same at the first study. Neonatal treatment reduced the average potency, at 60 days, in all doses used. It also changed evolution of characteristic of the number of stops and immobility time/number of stops relationship, at lowest doses, during development. In those animals submitted to neonatal handling, acute application of buspirone (5 mg/Kg) was made, at 70 days, and 30 minutes after administration, the locomotion was measured for 10 minutes. In all animals, locomotor activity was decreased, indicating a possible drug sedative effect. Noteworthy, we observed a reduction of covered distance and number of stops, and increased time of immobility. However, the group that received the highest dose of buspirone, during lactation, the reduction in covered distance was lower. In sum, neonatal administration with buspirone changes some parameters of locomotor activity. Acute administration of buspirone reduces locomotion. Nevertheless, at lower intensity in animals treated with the highest dose of the drug, during lactation, suggesting occurrence phenomenon of programming.

Keywords: locomotor activity, automatic analysis of locomotion, development, programming, serotonin, buspirone, open field, rats.

Sumário

	Página
1. Apresentação	9
1.1 Objetivos	11
1.2 Hipóteses	11
2. Revisão da Literatura	13
3. Material e Métodos	20
3.1 Animais	21
3.2 Estudo Da Evolução Ponderal	21
3.3 Sistemas De Análise Da Atividade Locomotora	21
3.4 Estudo Do Desenvolvimento Da Atividade Locomotora	24
3.5 Manipulação Farmacológica	25
3.6 Análises Estatísticas	26
4. Resultados	27
4.1 Artigo 1	28
4.2 Artigo 2	43
5. Considerações Finais	63
5.1 Perspectivas	66
6. Referências Bibliográficas	67
Anexos	77
Anexo A – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEAA) da UFPE	78

Apresentação

1 Apresentação

A locomoção é de vital importância para a vida de relação. Os animais necessitam locomover-se para obtenção de alimento, procura de parceiro para reprodução e nas situações de luta e fuga, sendo o comportamento motor fundamental para a preservação da espécie. Este comportamento segue uma sequência pré-determinada de desenvolvimento, sendo cada fase importante para obtenção do padrão locomotor funcional do adulto. Vários fatores podem influenciar a aquisição deste padrão, acelerando-a ou retardando-a. Fatores que atuem durante um período de maior vulnerabilidade dos sistemas relacionados à locomoção (neuro-músculo-esquelético) podem induzir alterações expressivas nesta. Algumas vezes, essas podem ter caráter irreversível. Estudos realizados pelo grupo Nutrição, Neuropsicofarmacologia e Imunidade (NNI) já demonstraram que a manipulação nutricional, no início da vida, é capaz de alterar o desenvolvimento e promover modificações tardias na atividade locomotora.

Além da nutrição, o nosso grupo estuda alterações sobre o desenvolvimento promovidas por manipulações dos sistemas de neurotransmissão, nos períodos pré- e pós-natal. Para tanto são utilizados fármacos que nos permitem alterar a produção, liberação, recaptação, ou até mimetizar a ação do próprio neurotransmissor. Em relação à influência da serotonina sobre o desenvolvimento, vários sistemas já foram alvos de estudos, como sistema digestório, circulatório, imunológico, além do comportamento agressivo, alimentar e locomotor. Neste último, dentre as alterações encontradas, observaram-se modificações no desenvolvimento reflexo e na atividade locomotora.

Outro aspecto estudado pelo grupo é a possibilidade de repercussões tardias, em virtude de manipulações precoces do sistema serotoninérgico. Sabe-se que alterações, induzidas na fase inicial da vida, podem promover modificações estruturais e funcionais, programando respostas alteradas, na vida adulta. Estas modificações podem diminuir a capacidade do organismo em se adaptar a situações adversas, tornando-o mais vulnerável a doenças.

A literatura refere diversos exemplos de manipulação farmacológica em animais. Poucos, porém, são os relatos que envolvem a manipulação crônica do sistema serotoninérgico, durante o período crítico do desenvolvimento, e a maturação da locomoção. Escassos também são os relatos sobre a manipulação de algum receptor específico. Este tipo de estudo permite a observação da função do receptor sobre a locomoção.

Esta dissertação está estruturada conforme a “Regulamentação da defesa e normas de apresentação dos Programas de Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde, da

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)”. Assim, a dissertação contém: revisão da literatura, material e métodos, resultados (artigo original 1 e 2) e considerações finais.

O Artigo Original 1, intitulado “Validação de sistema automático de análise da atividade locomotora em roedores”, será enviado para a revista “Journal of Neuroscience Methods”. Neste os autores apresentam um novo sistema de estudo da locomoção para roedores e realizam sua validação.

O Artigo Original 2, intitulado “Tratamento neonatal com agonista 5-HT_{1A}: influência sobre o desenvolvimento da locomoção e programação da resposta aguda à bupirona”, será enviado para a revista “Behavioural Brain Research”. O artigo apresenta estudo da manipulação com agonista parcial 5-HT_{1A}, em duas diferentes fases da vida, sobre a locomoção.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade locomotora, através de um sistema automático de análise, em ratos submetidos ou não à manipulação farmacológica com agonista 5-HT_{1A}.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar sistema de análise da locomoção para roedores;
- Analisar o desenvolvimento da atividade locomotora no 8º, 14º, 17º, 21º, 30º e 60º dia pós-natal, em ratos submetidos ao teste em campo aberto, através dos parâmetros: distância percorrida, velocidade média, potência média, tempo de imobilidade, número de paradas, relação tempo de imobilidade/número de paradas, e tempo de permanência nas áreas do campo;
- Avaliar os efeitos da manipulação crônica neonatal com bupirona sobre o desenvolvimento da atividade locomotora;
- Comparar a atividade locomotora entre os diferentes grupos experimentais e as diferentes idades estudadas;
- Avaliar os efeitos da aplicação aguda de bupirona sobre a locomoção, nos diferentes grupos experimentais, no 70º dia pós-natal.

1.2 Hipóteses

- O sistema de análise automática da atividade locomotora é capaz de avaliar de forma confiável e reproduzível a locomoção de roedores;
- O tratamento crônico neonatal com agonista parcial 5-HT_{1A} diminui a atividade locomotora, durante o período de manipulação e após seu término;
- A intensidade da ação do agonista parcial 5-HT_{1A} varia conforme a dose utilizada, onde doses maiores apresentam maior prejuízo à locomoção;
- Aplicação aguda de agonista parcial 5-HT_{1A} diminui a atividade locomotora, em ratos adulto-jovens;
- Em consequência do fenômeno da programação, a resposta à administração aguda do agonista parcial 5-HT_{1A} é menor nos animais que receberam o mesmo fármaco no período neonatal.

Revisão da Literatura

2 Revisão da Literatura

O desenvolvimento motor segue uma sequência pré-determinada e característica nas diferentes espécies (Muir, 2000). Para que este desenvolvimento ocorra de maneira coordenada, é necessário integridade, maturação e integração de diversos sistemas (sistema nervoso central – SNC – e músculo-esquelético, principalmente) (Fox, 1965; Gramsbergen, 1998). Em ratos, esta sequência já foi observada e descrita na literatura (Westerga e Gramsbergen, 1990).

Os primeiros movimentos dos membros, em ratos, ocorrem a partir do 16º dia embrionário (E16) (Gramsbergen, 1998). Aplicação de serotonina (5-HT) e aminoácidos excitatórios em preparados de medula espinhal isolada evoca, a partir de E20, um padrão de locomoção semelhante ao normal, chamada “locomoção fictícia” (Cazalets, Sqalli-Houssaini e Clarac, 1992; Iizuka, Nishimaru e Kudo, 1998). Este padrão é representado por movimentos alternados, tanto entre os lados direito/esquerdo quanto flexão/extensão (Iizuka, Nishimaru e Kudo, 1998, Vinay *et al.*, 2002).

A gênese da locomoção fictícia encontra-se nos geradores de padrão central (CPG, do inglês central pattern generators) (Jamon, 2006). O CPG localizado em C7-T1 controla a gênese dos movimentos dos membros anteriores (Ballion, Morin e Viala, 2001), enquanto que o controle dos membros posteriores encontra-se em L1-L5 (Cazalets, Sqalli-Houssaini e Clarac, 1992).

O CPG é capaz de produzir movimento sem aferências sensoriais ou eferências motoras centrais (Jamon, 2006). Entretanto, na locomoção normal, um comando central, envolvendo as vias reticuloespinhal, vestibuloespinhal, rubroespinhal e corticoespinhal, inicia e controla os tipos de movimentos através da modulação da atividade do CPG (Jamon, 2006).

O padrão adulto de postura da estrutura esquelética da coluna e da cabeça, de ratos, já está presente ao nascimento (sendo o dia do nascimento considerado P0) (Lelard *et al.*, 2006). Além disso, as projeções descendentes cerebrais, que iniciam e modulam o movimento, alcançam a medula espinhal alguns dias antes do nascimento (Clarac *et al.*, 1998; Jordan *et al.*, 2008). Mas, em P0, esses animais não apresentam padrão de locomoção voluntária (Muir, 2000).

No 1º dia de vida pós-natal (P1), ao ser colocado na água, o rato apresenta movimentos alternados das patas semelhantes à natação (Gramsbergen, 1998). Estudos com estimulação olfativa demonstraram que ratos poderiam apresentar padrão de locomoção semelhante ao do animal adulto (movimentos alternados de patas anteriores e posteriores),

logo após o nascimento (Fady, Jamon e Clarac, 1998; Jamon e Clarac, 1998). Entretanto, o caminhar é atrasado devido, em parte, ao pequeno controle da musculatura necessária para se contrapor à ação da gravidade (Geisler, Westerga e Gramsbergen, 1996; Gramsbergen, 1998; Clarac *et al.*, 1998; IJkema-Paassen e Gramsbergen, 2005). Esse controle da musculatura aumenta a partir do final da primeira semana pós-natal (Brocard, Vinay e Clarac, 1999; Gramsbergen *et al.*, 1999).

O primeiro padrão de movimento sobre o solo é o rastejar, onde a superfície ventral do corpo permanece em contato com este (Gramsbergen, 1998; Muir, 2000). Inicialmente, esse rastejar é realizado apenas com as patas anteriores, tendo a participação das quatro patas a partir de P4-P5, entretanto os membros posteriores apresentam-se em extensão (Clarac *et al.*, 1998; Gramsbergen, 1998). Estes achados também são observados a partir de teste de excitabilidade dos motoneurônios, onde aqueles que inervam a musculatura extensora maturam sua função mais tardiamente que aqueles da musculatura flexora (Vinay, Brocard e Clarac, 2000). Movimentos de flexão e extensão laterais do tronco, apresentados nesse período, favorecem o pivoteamento do animal e auxiliam na ativação da musculatura de tronco (Gramsbergen, 1998). Rastejar e pivoteamento são os tipos de locomoção predominantes até a metade da segunda semana pós-natal (Westerga e Gramsbergen, 1990; Clarac *et al.*, 1998). Durante este período, o animal começa a apresentar melhor ativação da musculatura extensora dos membros posteriores, como observado por mudanças na eletromiografia (EMG) (Brocard, Vinay e Clarac, 1999).

A partir da metade da segunda semana, o animal já consegue caminhar sustentando seu peso sobre as quatro patas (Clarac *et al.*, 1998). De P11 em diante, uma transição ocorre do rastejar para a caminhada com a superfície ventral do corpo longe do chão. (Westerga e Gramsbergen, 1990). A partir de então, há uma rápida maturação funcional dos membros posteriores (Clarac *et al.*, 1998) e aumento da atividade exploratória (Bâ e Seri, 1995). A melhora do padrão locomotor, concomitante ao aumento da ativação muscular, sugere que a musculatura tenha grande influência sobre o aparecimento do padrão adulto de locomoção (Geisler, Westerga e Gramsbergen, 1996). Em P14, aparecem os primeiros movimentos verticais (Clarac *et al.*, 1998). A partir de estudos de EMG, observou-se que, em P15, a ativação da musculatura de tronco começa a coincidir com ciclo de marcha, precedendo os movimentos do membro inferior (Geisler, Westerga e Gramsbergen, 1996). Considera-se que, a partir desta idade, o rato apresenta o padrão de marcha do adulto (Westerga e Gramsbergen 1990; Bâ e Seri, 1995; Clarac *et al.*, 1998; Gramsbergen, 1998). Sendo que até P21, ainda ocorrerão melhora na ativação da musculatura e maturação de algumas vias descendentes, até

atingirem o nível de função do animal adulto (Clarac *et al.*, 1998; Gramsbergen, 1998; Gramsbergen *et al.*, 1999). Além disso, haverá melhora da coordenação, permitindo realização de movimentos complexos (Bâ e Seri, 1995). A partir de P21, há coincidência na ativação da musculatura de tronco e membros inferiores, indicando que estes apresentarão maior papel na propulsão do que aqueles (Gramsbergen *et al.*, 1999). Tornando a locomoção mais eficiente do ponto de vista metabólico (Gramsbergen *et al.*, 1999). As alterações que ocorrerão a partir do desmame dizem respeito a refinamento da locomoção e a alterações comportamentais, como diminuição da atividade exploratória e aumento da habituação a novos ambientes (Bâ e Seri, 1995)

Como pode ser observado, há uma sequência para o desenvolvimento da locomoção, e esta segue gradiente rostro-caudal (Bâ e Seri, 1995; Clarac *et al.*, 1998). Sendo as três primeiras semanas pós-natal críticas para seu desenvolvimento (Walton *et al.*, 1992). Alterações, que ocorram durante este período, podem alterar permanentemente o padrão da locomoção (Walton *et al.*, 1992, 2005 a, b; Geisler e Gramsbergen 1998; Geisler *et al.*, 2000).

Insultos ambientais que ocorram precocemente podem modificar, de forma permanente, a estrutura e função de diversos órgãos (Dobbing, 1970; Lucas, 1991; Morgane *et al.*, 1993). Estudos epidemiológicos e experimentais constataram correlação entre estímulos ambientais durante o período crítico do desenvolvimento (fetal, neonatal e primeira infância) e surgimento de doenças ou alterações nas respostas fisiológicas normalmente esperadas, na vida adulta (Hales e Barker, 1992; Barreto-Medeiros *et al.*, 2002; Lopes de Souza *et al.*, 2008). Alterações permanentes na estrutura e função do organismo, decorrentes de agressões ambientais durante esses períodos, mecanismo conhecido como “programação”, poderiam explicar essa correlação (Lucas, 1991). Essas alterações prejudicariam a capacidade do organismo em responder a mudanças ambientais impostas na vida adulta, predispondo-o a doenças (Hales e Barker, 1992). Estudos realizados pelo grupo Nutrição, Neuropsicofarmacologia e Imunidade (NNI), da Universidade Federal de Pernambuco, têm verificado, em ratos, que a exposição a fármacos durante o período crítico do desenvolvimento induz alterações na vida adulta. A administração crônica de inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), durante período neonatal, reduziu o comportamento agressivo (Manhães-de-Castro *et al.*, 2001) e depressivo (Mendes-da-Silva *et al.*, 2002), promoveu redução do número de neurônios do plexo miotérico (Marinho, 2004) e do peso do encéfalo e fígado (Deiró, 1998), em ratos adulto-jovens.

Dentre os sistemas que influenciam o desenvolvimento e apresentam uma janela crítica onde estão sujeitos à atuação fatores adversos, e conseqüentemente da indução à

programação, encontra-se o sistema de neurotransmissão. Para a locomoção, o sistema de neurotransmissão que parece guardar maior relação e ser expressivamente influente, é o serotoninérgico (Gerin, Becquet e Privat, 1995; Geyer, 1996). A serotonina (5-HT) está relacionada ao desenvolvimento de diversos sistemas e atua na modulação de muitos comportamentos e funções (Lauder, 1988; Halford e Blundell, 1996; Imeri *et al.*, 1999; Jacobs e Fornal, 1999). A participação da 5-HT na iniciação ou modulação de funções motoras ocorre em numerosas espécies, desde aquelas mais simples, que possuem um sistema nervoso bastante primitivo (Kravitz, 1988; Lotshaw e Lloyd, 1990), até as mais complexas (Gerin, Becquet e Privat, 1995; Geyer, 1996).

Existem evidências farmacológicas que sugerem participação das vias serotoninérgicas supraespinhais na produção da locomoção no período pós-natal (Myoga *et al.*, 1995). As projeções serotoninérgicas alcançam a medula espinhal no 14º dia embrionário (E14), sendo uma das primeiras vias descendentes na região (Rajaofetra *et al.*, 1989; Clarac *et al.*, 1998). Servindo como sinal para diferenciação e estabilização para diversas populações neuronais, que se projetarão para a medula durante o desenvolvimento (Jacobs e Fornal, 1997). A aplicação de 5-HT em preparados de medula espinhal isolada de ratos é capaz de evocar locomoção fictícia, em fetos (Iizuka, Nishimaru e Kudo, 1998; Nakayama, Nishimaru e Kudo, 2001) e neonatos (Cazalets, Sqalli-Houssaini e Clarac, 1992; Ballion, Morin e Viala, 2001). Há indução de ritmicidade e ativação tônica (Ballion, Morin e Viala, 2001), atuando nas propriedades de disparo dos motoneurônios (Pflieger, Clarac e Vinay, 2002). Segundo Wallis (1994), os CPGs, localizados na medulas espinhal e que geram a locomoção fictícia são regulados pelos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} (Wallis, 1994). Porém não são conhecidos os mecanismos de atuação desses receptores sobre a locomoção (Wallis, 1994).

Entre os receptores serotoninérgicos, o receptor 5-HT_{1A} é muito conhecido e caracterizado (Peroutka e Snyder, 1979 *apud* Barnes e Sharp, 1999). Está localizado pré-sinápticamente em dendritos e corpos celulares de neurônios serotoninérgicos do núcleo da rafe (receptores somatodendríticos) e pós-sinápticamente em muitas regiões límbicas, principalmente no hipocampo (Barnes e Sharp, 1999). A ativação de receptores pré-sinápticos de 5-HT_{1A} inibe o disparo das células e consequentemente diminui a liberação da 5-HT, enquanto que a ativação dos receptores pós-sinápticos de 5-HT_{1A} induz inibição neuronal em partes seletivas do encéfalo (Barnes e Sharp, 1999) (Fig.1).

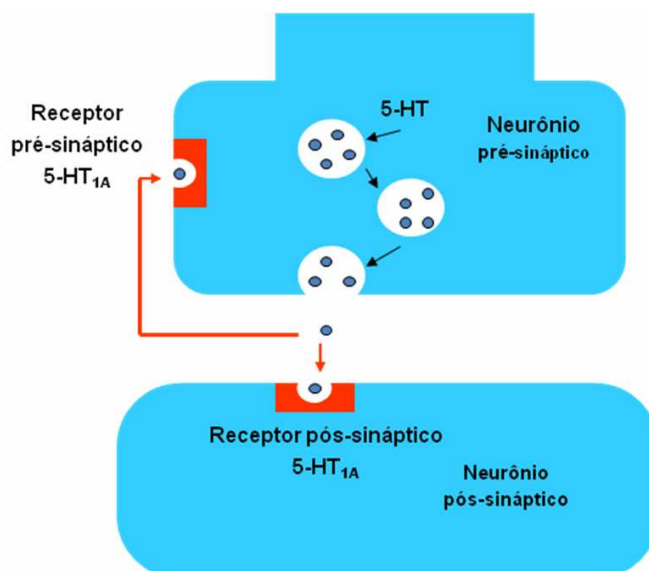


Figura 1. Representação da disposição dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} nos neurônios pré- e pós-sinápticos.

Manipulações farmacológicas com agonistas ou antagonistas 5-HT_{1A} podem promover alterações na atividade locomotora, no animal adulto (Myoga *et al.*, 1995; Angrini, Leslie e Shephard, 1997; Pruus *et al.*, 2000; Majercsik *et al.*, 2003; Bubeníková-Valesova *et al.*, 2007; Eskow *et al.*, 2007). Administração crônica de agonistas 5-HT_{1A}, em ratos com lesão medular, resulta na melhora da função motora, porém esse efeito não permanece após o término do tratamento (Antri *et al.*, 2003; Bravo *et al.*, 2007). Alguns estudos demonstram que a estimulação dos receptores 5-HT_{1A} diminui a atividade locomotora (Angrini, Leslie e Shephard, 1997, Pruus *et al.*, 2000; Majercsik *et al.*, 2003; Eskow *et al.*, 2007), enquanto outros que a aumenta (Evenden, 1994; Borella, Bindra, Whitaker-Azmitia, 1997; Mignon e Wolf, 2002).

Dentre os fármacos utilizados nas manipulações, encontra-se a bupiriona. Da família das azaspironas, atua como agonista parcial dos receptores 5-HT_{1A}, afetando os receptores pré-sinápticos e, em menor intensidade, os pós-sinápticos (Anderer, Saletu e Pasqual-Marqui, 2000). Além disso, atua também como antagonista dos receptores dopaminérgico D2 (Lima *et al.*, 2002). Tem ação ansiolítica (Carli, Prontera e Samanin, 1989), mas, ao contrário dos benzodiazepínicos, não apresenta propriedade de relaxante muscular, nem de anticonvulsivante (Tunnicliff, Eison e Taylor, 1991, *apud*, Tunnicliff *et al.*, 1992). Administração aguda de bupiriona reduz a síntese de 5-HT no encéfalo, entretanto, nas manipulações crônicas observa-se o aumento (Tunnicliff, *et al.*, 1992).

Em relação aos efeitos do uso da bupiriona na atividade locomotora, os achados são controversos. Alguns trabalhos demonstram que a bupiriona não afeta a atividade locomotora (Redrobe e Bourin, 1998; Harada *et al.*, 2006), outros, que a diminui (Angrini, Leslie e Shephard, 1997; Barros, 1999). Há ainda aqueles que demonstram aumento da atividade locomotora, porém este aumento geralmente é menor se comparado ao apresentado por outros agonistas do receptor 5-HT_{1A} (O'Neill e Sanger, 1999). Geyer (1996) sugeriu que doses baixas de agonistas 5-HT_{1A} diminuem, e, doses altas aumentam a atividade locomotora. A variedade na resposta motora a manipulações dos receptores 5-HT_{1A} parece depender da dose, da duração e na idade na qual tratamento foi realizado e do tipo de análise aplicada (Geyer, 1996; Borella, Bindra e Whitaker-Azmitia, 1997).

Diante do exposto, questionamos se a administração crônica, no período neonatal, de agonista parcial dos receptores 5-HT_{1A} altera o desenvolvimento da atividade locomotora e se programa a resposta à aplicação aguda do fármaco, em animais adulto-jovens.

Uma das formas de se estudar locomoção, em animais, é através do teste em campo aberto (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001; Prut e Belzung, 2003; Basso *et al.*, 2006; Dunne, O'Halloran, Kelly, 2007). Apesar de ter sido desenvolvido com outra função (Prut e Belzung, 2003), este aparato vem sendo cada vez mais utilizado para estudos da atividade locomotora. A locomoção no campo aberto pode ser avaliada através da análise observacional (Barros, 1999) ou automatizada (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001; Dunne, O'Halloran, Kelly, 2007; Kulikov, Tikhonova, Kulikov, 2008). Sendo que a última apresenta vantagens como maior confiabilidade e reprodutibilidade, em relação à primeira (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). Nas análises automáticas, vários parâmetros da locomoção podem ser avaliados, tornando os sistemas de análises diferentes entre si (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001; Dunne, O'Halloran, Kelly, 2007; Kulikov, Tikhonova, Kulikov, 2008). Desta forma, um sistema de monitoramento e análise adequado as características de cada estudo é necessário, para evitar possíveis erros na aquisição e interpretação dos dados.

Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados 72 ratos albinos da linhagem *Wistar*, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, num ciclo invertido de luz (21:00 às 09:00) e escuridão (09:00 às 21:00) constante.

Inicialmente, machos reprodutores e fêmeas nulíparas, com idade de 100 dias, passaram por um período de 15 dias de adaptação ao ciclo de luz invertido. Após este período os animais foram acasalados (2 fêmeas / 1 macho), fazendo-se o diagnóstico de gravidez através da aferição, a cada 3 dias, do peso corporal. Confirmado o estado de gestação, as ratas foram alojadas individualmente em gaiolas-maternidade, onde tiveram livre acesso à água e dieta padrão do biotério (ração LABINA - Purina do Brasil).

Um dia após o nascimento, os neonatos foram separados das respectivas mães, pesados e selecionados. Foram escolhidos os machos com peso entre 6,0 e 8,0 g, sendo sacrificados os neonatos abaixo ou acima dos referidos limites de peso e as fêmeas. Os neonatos selecionados foram aleatoriamente distribuídos entre as mães-adotivas. Foram constituídas ninhadas de oito filhotes cada. Os animais foram amamentados durante os primeiros 21 dias pós-natais (período de aleitamento). A partir do 21º dia de vida os filhotes foram separados das mães (desmame), ficando em gaiolas conjuntas até o final dos experimentos.

3.2 Estudo Da Evolução Ponderal

A aferição do peso corporal foi realizada diariamente, do 1º ao 21º dia e no 30º, 40º, 50º, 60º, 69º e 70º dia pós-natal, entre 12:00 e 14:00 horas. Foi utilizada balança eletrônica digital, marca Marte AS 1000C, classe II, capacidade máxima 1000g (menor divisão 0,01g).

3.3 Sistemas De Análise Da Atividade Locomotora

Sistema De Monitoramento

Um sistema de monitoramento do movimento de pequenos animais em campo aberto foi desenvolvido em cooperação com o Departamento de Física e colaboração do Curso de

Graduação em Engenharia Biomédica, ambos da UFPE. O sistema consiste em um campo aberto circular ($\varnothing 1\text{m}$), delimitado por paredes de 30 cm de altura (Fig. 2A, 3A). O campo apresenta suas superfícies internas pintadas de preto, e sobre sua base foi disposta uma superfície macia de EVA (etil vinil acetato), também preta, com objetivo de facilitar a locomoção do animal e proporcionar um maior contraste com este (Fig. 2A, 3A).

Posicionou-se na linha vertical que passa pelo centro do campo aberto, fixada ao teto da sala, uma câmera digital (VTR@6638 – CCTV System) que filma o animal enquanto este se movimenta livremente (Fig. 2B). Sua distância do local de fixação até o solo do campo é de 2,40 m. A câmera possui sensor de infravermelho e um LED de iluminação. Apresenta resolução de 420 linhas, velocidade entre 1/60 e 1/100 s, e sua sensibilidade permite registrar imagens com iluminação mínima, até 0,1 lux. A câmera foi acoplada ao computador através de placa de captura.

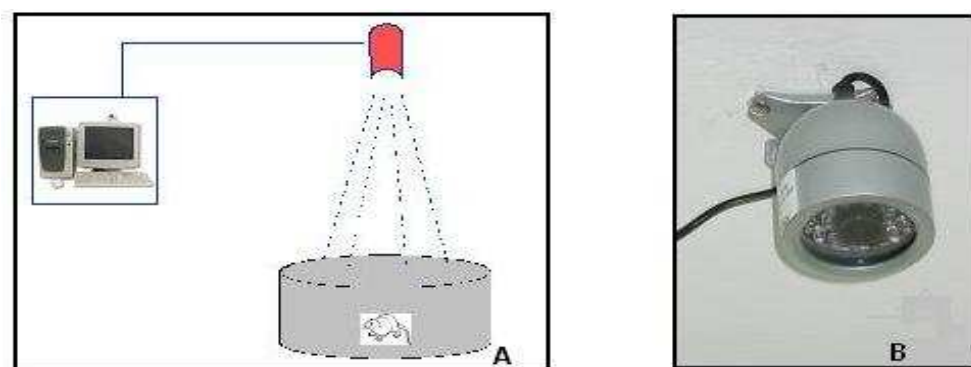


Figura 2: **A** – Representação esquemática do campo aberto e do sistema de monitoramento; **B** – Câmera utilizada para o registro de imagens.

Sistema De Análise

Através de um *software* de captura, o filme é enviado ao computador. Possuindo taxa de captura de 30 quadros por segundo, tendo o vídeo 240 pixels de altura e 320 pixels de comprimento. Os vídeos foram salvos no formato AVI. Sendo posteriormente divididos em quadros, para análise (Fig. 3B). No *software* Paint[®], confeccionou-se uma máscara com o objetivo de isolar a imagem do animal no campo dos objetos ao redor (Fig. 3C).

Também foi desenvolvido um *software* para análise das imagens captadas. Este tem como base o programa MATLAB[®], sendo capaz de realizar o processamento dos quadros retirados de cada vídeo (Fig. 3D). Através de uma interface, o avaliador inseria dados para cadastro do animal e informações que seriam utilizadas para análise dos quadros.

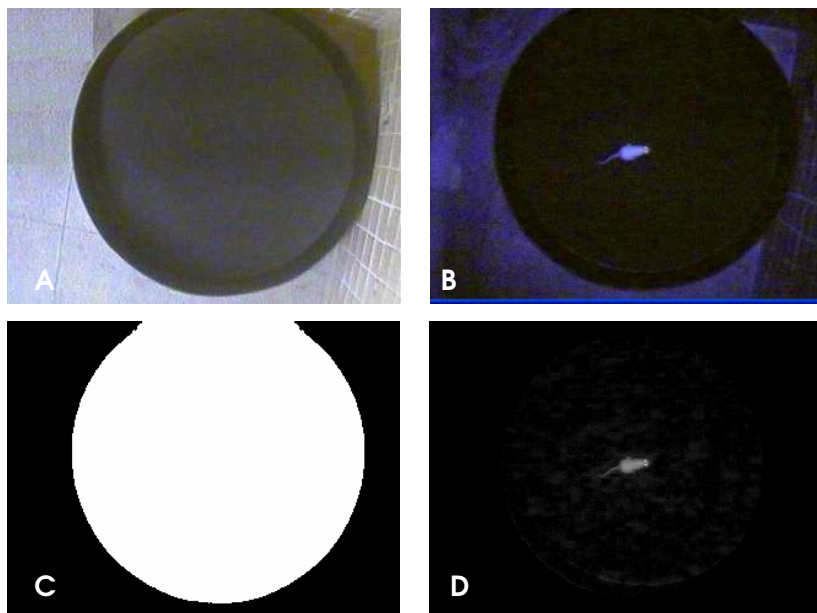


Figura 3: **A)** Vista superior do campo aberto em ambiente claro. **B)** Exemplo de imagem do rato no campo aberto em ambiente escuro. **C)** Máscara utilizada para isolar imagem. **D)** Imagem final (figura C sobre figura B), utilizada nos cálculos dos parâmetros estudados.

Devido à diferença de cor entre o campo aberto e o animal, o programa utilizou o reconhecimento da intensidade de pixels para estabelecer todos os pontos que formavam a imagem do animal, determinando seu ponto médio. Este ponto passava a representar o animal. A partir disto, era determinada coordenada xy do animal, em cada quadro. Uma escala de pixels foi elaborada, pois os animais apresentavam diferenças na pelagem entre as idades avaliadas. Cada valor limite era inserido pelo avaliador.

De posse da posição do animal em cada quadro, foi possível reconstituir sua trajetória e adicionando-se as informações da massa, do número de quadros e tempo entre cada quadro, foi possível estabelecer:

- Distância percorrida (m): somatório de todos os deslocamentos realizado pelo animal. Considerou-se que o animal estava em movimento quando percorria 50% de seu comprimento em, no máximo, três quadros. O programa apresentava um conversor interno de pixels-metros, onde a escala de conversão era adicionada pelo pesquisador.
- Velocidade média (m/s): relação do deslocamento total pelo tempo em que o animal estava em movimento. Fórmula: $\Delta S / \Delta T$, onde ΔS corresponde ao deslocamento total em metros, e ΔT ao tempo total de análise menos o tempo de parada em segundos.
- Potência média (mW): potência produzida durante o período de deslocamento. Foi considerada a capacidade de um corpo em movimento dissipar energia cinética, em relação ao tempo de deslocamento. Fórmula: $mV^2 / 2\Delta T$, onde m corresponde à massa

do animal em gramas, V à velocidade média em m/s, e ΔT ao tempo total de análise menos o tempo de parada em segundos.

- Tempo de parada (s): tempo total que o animal permanecia parado no campo aberto.
- Número de parada: número total de paradas realizadas no campo.
- Relação tempo de imobilidade/número de paradas (s): relação entre o tempo total que o animal permanecia parado no campo aberto e o número total de paradas;
- Tempo de permanência nas áreas (s): o campo aberto foi dividido, virtualmente, em três áreas. Sendo determinado o tempo total de permanência dos animais nessas áreas (Fig. 4).

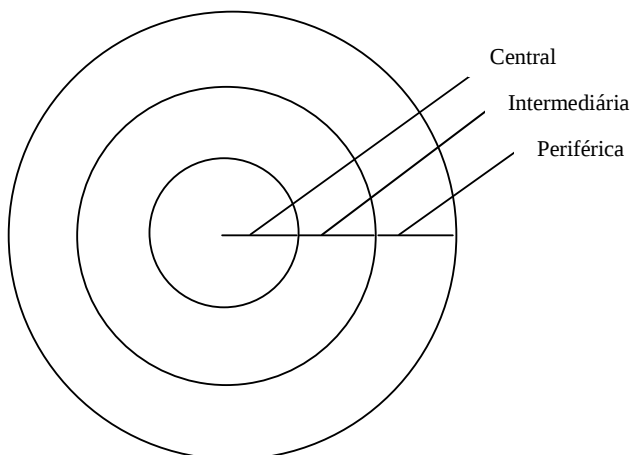


Figura 4: Representação das áreas, virtualmente criadas, para análise do tempo gasto pelos animais em cada região do campo. As áreas apresentavam raios de 0,165, 0,33, 0,5 metros, (área central, intermediária e periférica, respectivamente).

Todos os dados acima foram extraídos do MATLAB® e exportados para Microsoft Office Excel®, para posterior análise.

3.4 Estudo Do Desenvolvimento Da Atividade Locomotora

No 8º, 14º, 17º, 21º, 30º e 60º dia de vida pós-natal, os animais foram posicionados no centro do campo aberto e filmados durante 2 minutos, enquanto se locomoviam livremente. Na troca dos animais, o campo foi limpo com solução de água e hipoclorito, e o EVA trocado, para eliminar odores que pudessem interferir no comportamento do animal seguinte.

As datas na fase neonatal foram escolhidas por representarem marcos no desenvolvimento locomotor (Westerga e Gramsbergen, 1990). As avaliações foram realizadas

durante a fase escura do ciclo circadiano (entre 12:00 e 14:00), para respeitar o maior período de atividade do animal (Tang, Yang e Sanford, 2007).

No período neonatal, os animais que recebiam manipulação farmacológica (ver item 3.5, subitem Manipulação Farmacológica Crônica) foram avaliados antes de receberem as injeções do dia.

Aos 69 e 70 dias de vida, alguns animais também foram filmados, dessa vez por 10 minutos, para estudo da ação aguda do fármaco (ver item 3.5, subitem Manipulação Farmacológica Aguda)

Todos os vídeos provenientes das filmagens foram analisados pelo sistema de análise descrito no item 3.3. O conjunto dos parâmetros avaliados foi considerado para estudo da atividade locomotora.

3.5 Manipulação Farmacológica

Todas as manipulações farmacológicas foram realizadas, em sala escura contígua ao biotério, entre 12:00 e 14:00, após aferição do peso corporal. O volume utilizado foi sempre de 1 ml para cada 100g de peso corporal. Para facilitar a visão do pesquisador e minimizar a ação da luz sobre os animais, utilizou-se lâmpada vermelha de 25 W, na sala.

Manipulação Farmacológica Crônica

Os animais que participaram deste estudo foram divididos, equitativamente, segundo a manipulação farmacológica diária, do 1º ao 21º dia pós-natal, nos seguintes grupos:

- *Salina* (Sal) - tratado com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%;
- *Buspirona 2,5mg/Kg* – tratado com Buspirona na dose 2,5 mg/Kg;
- *Buspirona 5mg/Kg* – tratado com Buspirona na dose de 5 mg/Kg;
- *Buspirona 10mg/Kg* – tratado com Buspirona na dose de 10 mg/Kg.

A Buspirona foi obtida a partir do sal (Buspirona HCl – Vico-farma, Brasil) diluído em solução salina. Neste estudo, a via de administração foi subcutânea.

Manipulação Farmacológica Aguda

Aos 70 dias, todos os animais, que foram manipulados no período neonatal, receberam injeção de Buspirona na dose de 5 mg/Kg, via intraperitoneal. O horário, volume da

administração e diluição da droga seguiram o descrito anteriormente. Trinta minutos após a administração, os animais foram submetidos à filmagem em campo aberto (item 3.4).

Dose, via de administração e latência para observação foram escolhidas de acordo com dados da literatura (Angrini, Leslie e Shephard, 1997; Pruus *et al.*, 2000; Majercsik *et al.*, 2003).

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE, processo nº 008864/2007-76, em 04 de setembro de 2007 (Anexo A).

3.6 Análises Estatísticas

Todos os dados foram analisados estatisticamente através do software SigmaStat (v.3.1). Para todos, foi realizado, inicialmente, teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov).

Os testes estatísticos utilizados estão descritos em cada artigo. Em todos os casos um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Resultados

4.1 Artigo Original 1

Validação de sistema automático de análise da atividade locomotora em roedores

Resumo

Análise automática da locomoção, em estudos de comportamento e desenvolvimento, é de grande importância, pois elimina a subjetividade e influência dos avaliadores sobre o estudo. Este trabalho teve por objetivo desenvolver um sistema de análise automática da atividade locomotora em ratos. Para validação foram utilizados 19 ratos Wistar machos, avaliados em P8, P14, P17, P21, P30 e P60. Para esta análise, foi desenvolvido um sistema de monitoramento, que consisti em um campo aberto de 1m de diâmetro, com suas superfícies na cor preta, uma câmera digital com infravermelho e uma placa de captura de vídeo. Os animais foram filmados durante dois minutos, enquanto se movimentavam livremente no campo. As imagens foram enviadas para um computador acoplado a câmera. Posteriormente, os vídeos foram analisados através de software desenvolvido com a utilização do MATLAB® (software matemático). O software foi capaz de extrair, a partir do reconhecimento de pixels que constituíam a imagem, os seguintes parâmetros: distância percorrida, velocidade média, potência média, tempo de imobilidade, número de parada, tempo de permanência nas diferentes áreas do campo e relação tempo de imobilidade/número de paradas. Todos os dados foram exportados para posterior análise. O sistema mostrou-se capaz de extrair eficazmente os parâmetros desejados. E, dessa forma, foi possível observar modificações no padrão de locomoção dos animais, decorrentes do seu desenvolvimento. Assim, pode-se discutir semelhanças e diferenças entre o sistema apresentado e outros já existentes.

Palavras-chaves: atividade locomotora, ratos, análise automática da locomoção, campo aberto

1 Introdução

A aquisição da locomoção é uma habilidade importante para o adequado desenvolvimento dos seres vivos. Este ocorre num período determinado, de acordo com as características de cada espécie. Estudos sobre o comportamento motor são realizados não só para a análise do seu desenvolvimento (Barros et al., 2006), como também para investigar os possíveis efeitos de diferentes estados nutricionais (Barros et al., 2006; Bellinger et al., 2006) ou uso de fármacos (Prut e Belzung, 2003) sobre este. Diferentes métodos podem ser utilizados para este tipo de estudo. Um aparato largamente utilizado é o campo aberto (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001; Prut e Belzung, 2003; Barros et al., 2006; Basso et al., 2006; Bellinger et al., 2006). Este, inicialmente, tinha como objetivo auxiliar no estudo da emocionalidade em roedores (Hall, 1934). Entretanto, com o passar dos anos, sua utilidade foi ampliada, além de terem sido adicionadas algumas modificações em suas características, como: forma, luminosidade, presença de objetos dentro da arena, entre outras (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001; Prut e Belzung, 2003). Em relação aos procedimentos utilizados,

também ocorreram algumas variações, como: posicionamento inicial do animal (centro ou periferia do campo), número de animais observados em um mesmo momento, horário e tempo total de observação (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001; Prut e Belzung, 2003).

Avaliações do comportamento apresentado no campo aberto podem ser realizadas através de análises observacionais ou automáticas (ou semi-automática). Na primeira, o pesquisador observa o animal durante certo tempo, e, se julgar que este expressou certo comportamento, anota as informações. (Barros et al., 2006). Este procedimento apresenta baixo custo para o pesquisador, mas tem como inconveniente a possibilidade da influência de sua presença, no comportamento apresentado pelo animal (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). Além disso, pode haver interferência da interpretação pessoal e da fadiga do observador sobre os resultados, o que pode dificultar a confiabilidade e reprodutibilidade dos experimentos (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). Os parâmetros avaliados geralmente incluem: deslocamento horizontal e vertical, e comportamentos não relacionados à locomoção, como limpeza.

Nas avaliações automáticas (ou semi-automáticas), o animal manifesta seu comportamento livremente, enquanto são realizados registros da locomoção (vídeos, interrupções de fotocélulas, entre outros) (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). As análises dos dados podem ser realizadas ao mesmo tempo ou posteriormente através das informações armazenadas (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). Diferentes técnicas podem ser empregadas para aquisição de informação do campo aberto, desde fotocélulas de infravermelho (Bellinger et al., 2006) à captura de imagens (Sams-Dodd, 1995; Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). As análises a partir de imagens, geralmente, apresentam maior custo que as análises observacionais, mas sofrem menor influência do pesquisador durante a aquisição e no tratamento dos dados (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001; Kulikov, Tikhonova, Kulikov, 2008). Frequentemente, são utilizados algoritmos que analisam todos os dados da mesma forma (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001; Kulikov, Tikhonova, Kulikov, 2008). Há ainda a possibilidade de aquisição de dados mais precisos, como deslocamento do animal, velocidade desenvolvida, tempo e frequência em que apresentou determinado comportamento, entre outros (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). Além disso, testes de longa duração podem ser realizados, pois não há a necessidade da presença do pesquisador durante a aquisição (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). Tudo isto em conjunto, torna esse tipo de análise mais ampla, confiável e reproduzível. Contudo, alguns comportamentos, podem não ser bem definidos por esta, sendo necessária, a depender do

objetivo do estudo, a utilização conjunta da análise observacional e automática (Sams-Dodd, 1995).

Em razão das diferenças nas condições do ambiente onde é realizada a aquisição dos dados, da espécie analisada (rato, camundongo) e do objetivo do estudo, diferentes programas de análises são desenvolvidos. Estes têm o objetivo de se adequarem às peculiaridades de cada estudo. Portanto, este trabalho teve como meta o desenvolvimento de um sistema automático de avaliação da atividade locomotora de ratos, em campo aberto, a partir da análise de imagens digitais. Sendo este capaz de analisar parâmetros físicos e comportamentais. Este sistema deve apresentar-se sensível o bastante para detectar alterações na atividade locomotora. Para validação, foi analisado o desenvolvimento da locomoção em ratos de diferentes idades (da fase neonatal à maturação sexual). Os dados foram discutidos em função da comparação deste método com outros existentes.

2 Material e Métodos

2.1 Animais

Para validação, foram utilizados 19 ratos Wistar machos, do Biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram mantidos em uma sala de temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e ciclo claro-escuro 12h/12h (luzes acesas às 21h). Vinte e quatro horas após o nascimento (P1), os animais foram selecionados e distribuídos em maternidades com oito filhotes cada. Eventualmente, fêmeas foram utilizadas para completar o número de filhotes, não sendo utilizadas nas análises. O desmame ocorreu no 21º dia pós-natal (P21), após o desmame cada gaiola continha, no máximo, quatro animais. Estes foram alojados em gaiolas de polipropileno (46x34x20 cm). Água e dieta padrão (Labina – Purina do Brasil) foram ofertadas livremente. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da Universidade Federal de Pernambuco e seguem as recomendações do National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

2.2 Sistema de Monitoramento

Consiste em um campo aberto circular ($\varnothing 1\text{m}$), delimitado por paredes de 30 cm de altura. Suas superfícies internas foram pintadas de preto e, sobre sua base, foi disposta uma superfície macia de EVA (etil vinil acetato), também preta, com objetivo de facilitar a locomoção do animal e proporcionar um maior contraste com este (Fig. 1A). Na linha vertical

que passa pelo centro do campo aberto, foi fixada ao teto da sala uma câmera digital (VTR®6638 – CCTV System) que filma o animal enquanto este se movimenta livremente. Sua distância do local de fixação até o solo do campo foi de 2,40 m. Apresenta resolução de 420 linhas e velocidade entre 1/60 e 1/100 quadros por segundo, possui sensor de infravermelho, LED de iluminação infravermelha, sua sensibilidade permite registrar imagens com iluminação mínima, de até 0,1 lux. A sala onde os experimentos foram realizados apresentava luminosidade menor que 1 lux. Este tipo de câmera é importante, pois permite realizar experimentos com animais durante a fase escura do ciclo.

A câmera foi acoplada ao computador através de placa de aquisição de vídeo. Sua taxa de captura de imagem foi configurada em 30 quadros por segundo, tendo o vídeo 240 pixels de altura e 320 pixels de comprimento. Sendo salvos diretamente no computador, no formato AVI. Posteriormente, os vídeos foram divididos em quadros, para análise (Fig.1B). No software Paint[®], confeccionou-se uma máscara com o objetivo de isolar a imagem do animal no campo dos objetos ao redor (Fig 1C).

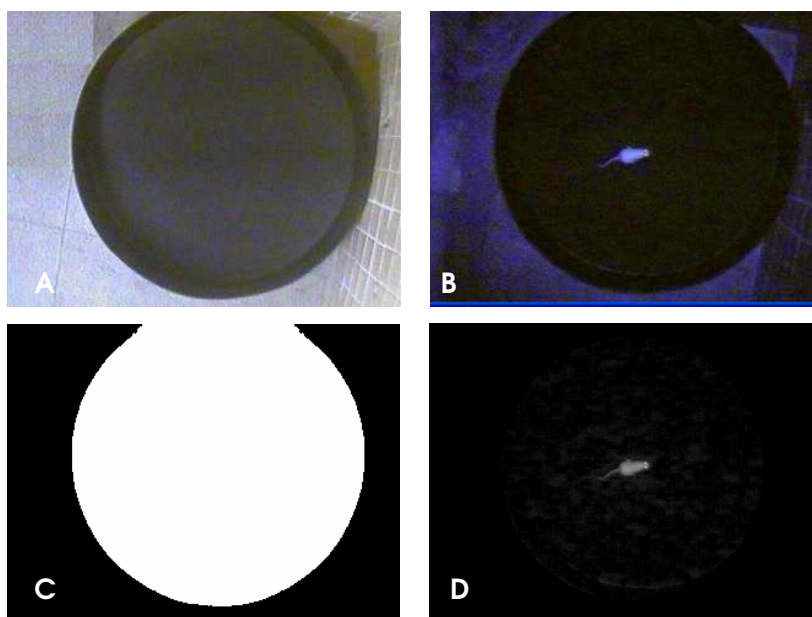


Figura 1: A) Vista superior do campo aberto em ambiente claro. B) Exemplo de imagem do rato no campo aberto em ambiente escuro. C) Máscara utilizada para isolar campo. D) Imagem final (figura C sobre figura B), utilizada nos cálculos das variáveis físicas.

2.3 Sistema de Análise

Foi desenvolvido um software, em plataforma MATLAB[®] para análise das imagens extraídas de cada vídeo (Fig. 1D). Através de uma interface, o avaliador insere os dados para

cadastro do animal e informações que são utilizadas para análise dos quadros (massa, número de quadros, tempo entre quadros).

Devido à diferença de cor entre o campo aberto e o animal, o programa pode utilizar o reconhecimento através da intensidade de pixels para estabelecer todos os pontos que formam a imagem do animal. O sistema de análise binariza as imagens por um processo de limiarização. Um valor fixo em pixels, referente ao limiar reconhecido pelo programa, foi elaborado para cada idade, pois os animais apresentam diferenças na tonalidade da pelagem devidas ao crescimento. O valor de cada limite foi inserido pelo avaliador, respeitando uma escala com valores específicos para cada idade, evitando-se erros no reconhecimento do animal. O programa determina o ponto médio que forma a imagem do animal e este passa a representá-lo. A partir desse ponto, foi determinada, em cada quadro, a coordenada xy do animal. De posse da posição do animal quadro a quadro, foi possível reconstituir sua trajetória e adicionando-se as informações da massa, do número de quadros e tempo entre cada quadro, foi possível estabelecer:

- Distância percorrida (m): somatório de todos os deslocamentos realizado pelo animal. Considerou-se que o animal estava em movimento quando percorria uma distância superior a 50% de seu comprimento em, no máximo, três quadros. O programa apresentava um conversor interno de pixels-metros, onde a escala de conversão era adicionada pelo pesquisador.
- Velocidade média (m/s): relação do deslocamento total pelo tempo em que o animal permaneceu em movimento. Fórmula: $\Delta S / \Delta T$, onde ΔS corresponde ao deslocamento total em metros, e ΔT ao tempo total de análise menos o tempo de parada em segundos.
- Potência média (mW): potência produzida durante o período de deslocamento. Foi considerada a capacidade de um corpo em movimento dissipar energia cinética, em relação ao tempo de deslocamento. Fórmula: $mV^2 / 2\Delta T$, onde m corresponde à massa do animal em gramas, V à velocidade média em m/s, e ΔT ao tempo total de análise menos o tempo de parada em segundos.
- Tempo de imobilidade (s): tempo total que o animal permanecia parado no campo aberto.
- Número de paradas: número total de paradas realizadas no campo.
- Tempo de imobilidade/número de paradas (s): relação entre o tempo de imobilidade e o número total de paradas.

- Tempo de permanência nas áreas (s): o campo aberto foi dividido, virtualmente, em três áreas (central, intermediária, periférica, com raios de 0,165, 0,33 e 0,50 m respectivamente) (Fig.2). Sendo determinado o tempo total de permanência dos animais nessas áreas.

Estes cálculos são efetuados considerando fisicamente o animal em movimento como um objeto pontual dotado de uma determinada massa e executando movimento aleatório. Os movimentos que não deslocam o centróide da imagem do animal monitorado, tais como simples movimentos de cabeça, não são considerados no cálculo, mas apenas aqueles movimentos que deslocam a posição do animal. Assim, considera-se que toda energia potencial muscular é transformada em energia cinética associada ao movimento efetivo do centróide da imagem do animal monitorado, o que é bastante adequado quando só interessa monitorar a atividade locomotora do animal.

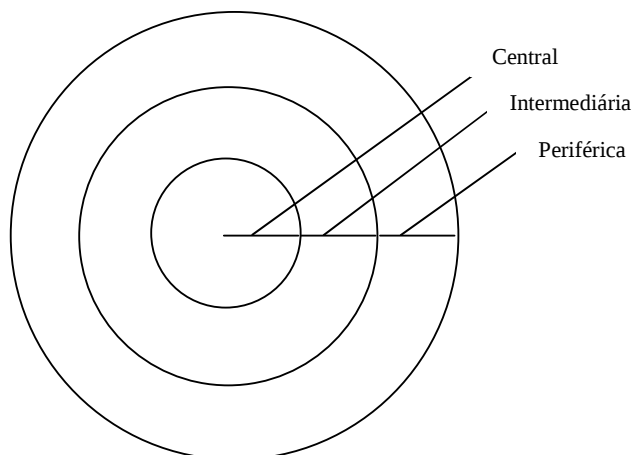


Figura 2: Representação das áreas, virtualmente criadas, para análise do tempo gasto pelos animais em cada região do campo. As áreas apresentavam raios de 0,165, 0,33, 0,5 metros, (área central, intermediária e periférica, respectivamente).

2.4 Validação

Os animais foram avaliados em P8, P14, P17, P21, P30 e P60. As datas na fase neonatal foram escolhidas por representarem marcos no desenvolvimento locomotor (Westerga e Gramsbergen, 1990). As avaliações foram realizadas durante a fase escura do ciclo circadiano (entre 12:00 e 14:00), para respeitar o maior período de atividade do animal. Cada animal foi posicionado, individualmente, no centro do campo aberto e filmado durante dois minutos, enquanto se movimentava livremente. Na troca dos animais, o campo foi limpo com solução de água e hipoclorito, e o EVA trocado, para eliminar odores que pudessem interferir no comportamento do animal seguinte.

2.5 Análises estatísticas

Os dados foram analisados estatisticamente através do software SigmaStat (v. 3.1). Após a realização de teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), foi realizado o Anova one way para medidas repetidas e, como pós-teste, utilizou-se o teste de Tukey, nos parâmetros distância percorrida, velocidade média, potência média, tempo de parada e número de paradas. Na relação tempo de imobilidade/número de paradas, foi utilizado Friedman, seguido do teste de Dunn's e, para o parâmetro tempo de permanência nas áreas, foi realizado Anova two way (idade x área) para medidas repetidas, seguido do teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

3 Resultados

Os animais apresentaram evolução ponderal normal, de acordo com o descrito na literatura para a espécie e idades (dados não apresentados). Em relação à distância percorrida, foi possível observar aumento progressivo com a idade, até o 21º dia pós-natal ($p < 0,001$) (Fig. 3A). Não houve diferença entre P21 e P30. Foi observado um decréscimo na distância percorrida entre P30 e P60 ($p = 0,031$) (Fig. 3A). A velocidade média apresentou aumento progressivo com a idade, com diferença entre todas as idades avaliadas ($p < 0,001$) (Fig. 3B). Ao avaliar potência média produzida, foi verificado aumento discreto no início da vida, apresentando diferença apenas entre P21 e P30, e P30 e P60 ($p < 0,001$) (Fig. 3C).

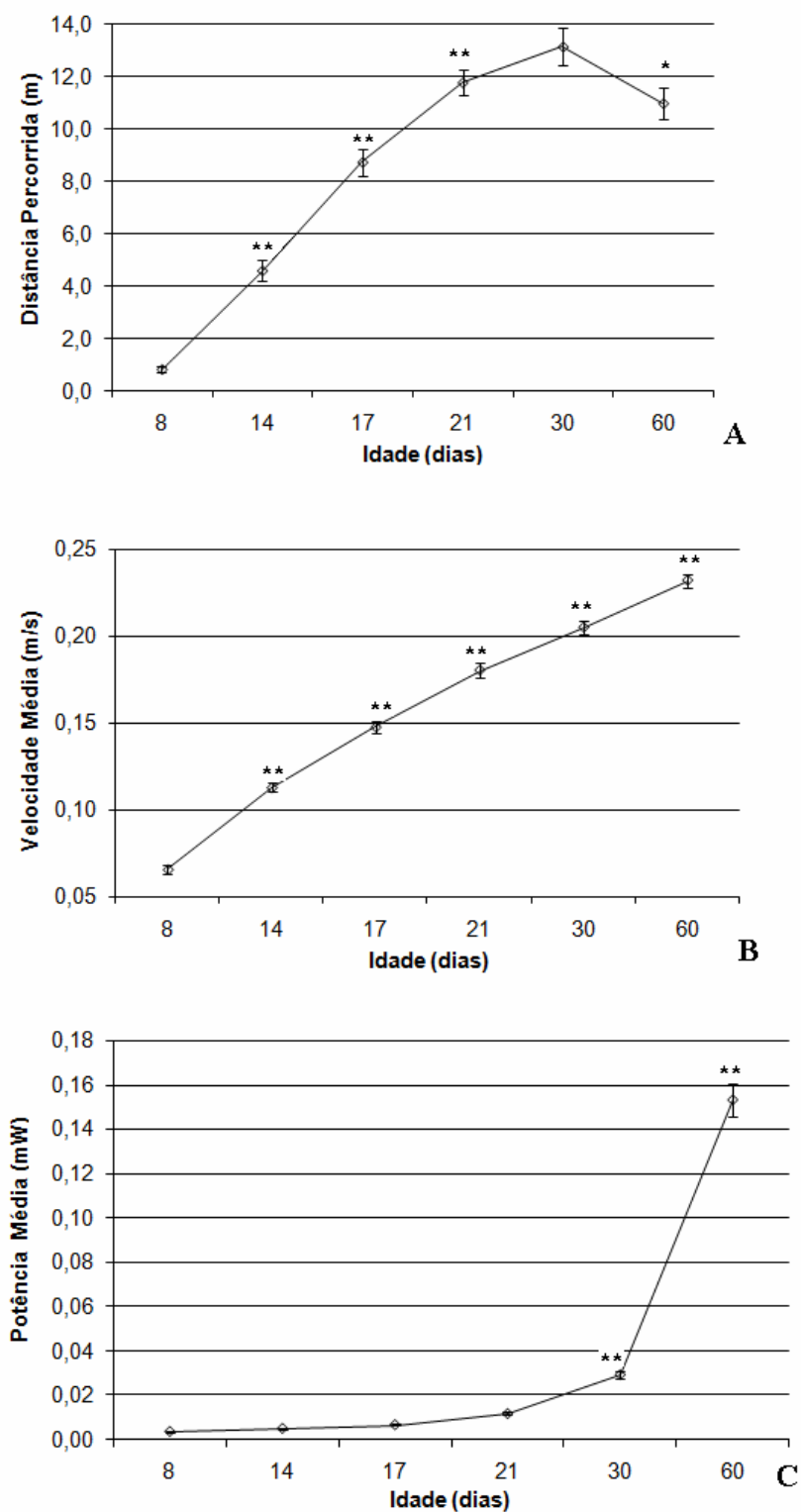


Figura 3 – Desenvolvimento da atividade locomotora. Ratos normais (n=19) foram avaliados em campo aberto, nas idades apresentadas, durante dois minutos. A, Distância Percorrida (m); B, Velocidade Média (m/s); C, Potência Média (mW). Valores em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, vs. idade anterior, Anova one way para medidas repetidas, pós-teste Tukey.

Ao avaliar o tempo em que o animal permaneceu parado no campo, foi observado um declínio até P17, havendo diferença entre P8 e P14, e P14 e P17 ($p<0,001$) (Fig. 4A). No sentido inverso, houve aumento no tempo de imobilidade em P60 quando comparado ao P30 ($p<0,001$) (Fig. 4A). O número de paradas no campo aberto apresentou um aumento entre P8 e P14 ($p<0,001$), seguido por um declínio entre P14 e P17 ($p<0,001$) (Fig. 4B). Posteriormente, aos 60 dias, foi verificado outro aumento no número de paradas ($p<0,001$) (Fig. 4B). O tempo médio gasto pelo animal em cada parada apresentou redução entre P8 e P14 ($p<0,001$), mantendo-se constante nas outras idades (Fig. 5).

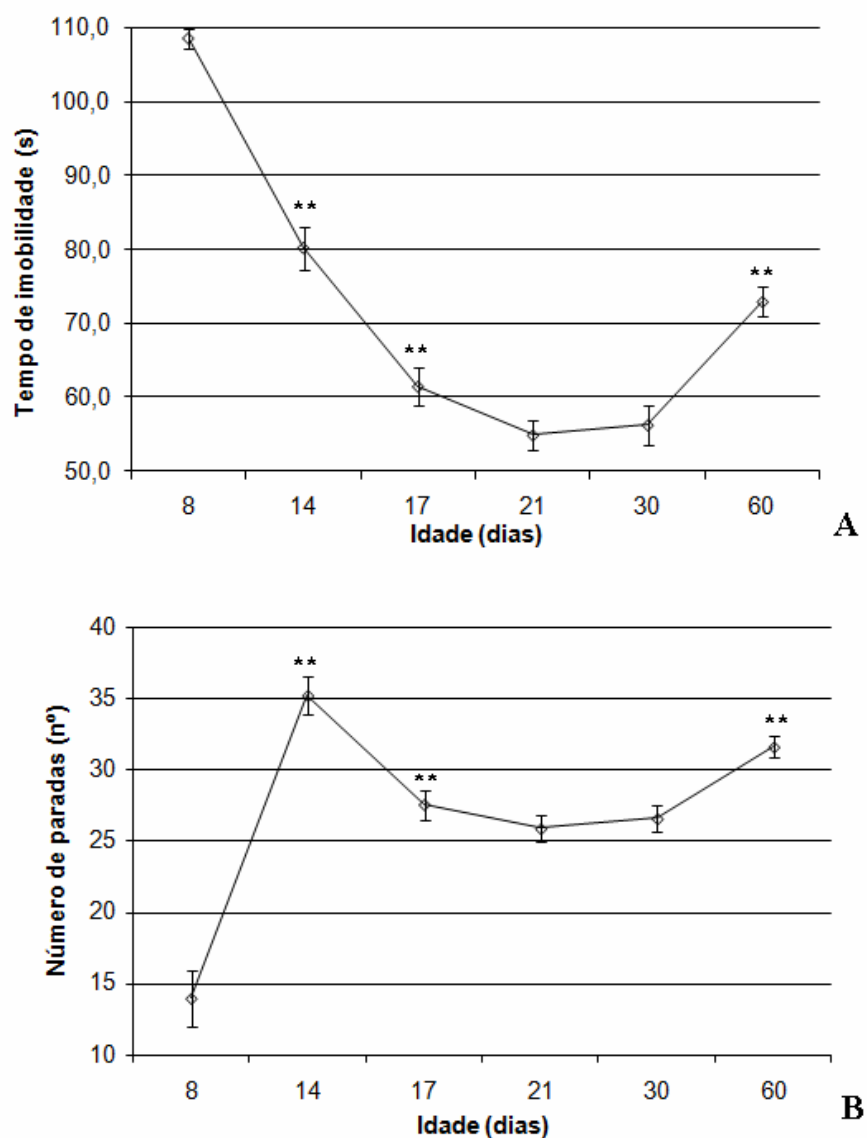


Figura 4 – Desenvolvimento da atividade locomotora. Ratos normais ($n=19$) foram avaliados em campo aberto, nas idades apresentadas, durante dois minutos. Tempo de imobilidade (A), número de paradas(B). Valores em média $\pm$ EPM. ** $p<0,001$, vs. idade anterior, Anova one way para medidas repetidas, pós-teste Tukey.

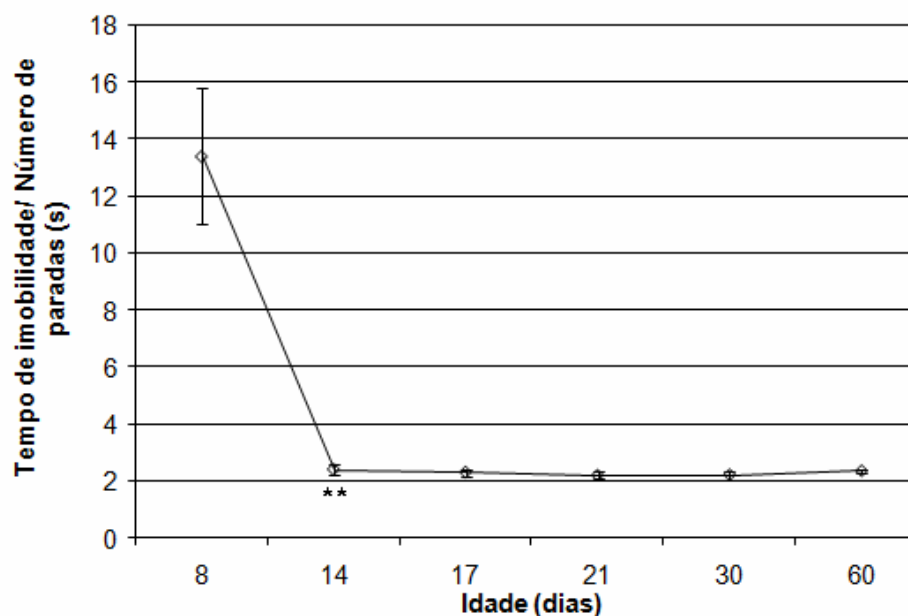


Figura 5 – Desenvolvimento da atividade locomotora. Ratos normais (n=19) foram avaliados em campo aberto, nas idades apresentadas, durante dois minutos. Relação tempo de imobilidade/número de paradas (s). Valores em média $\pm$ EPM. ** $p < 0,001$, vs. idade anterior, Friedman, pós-teste Dunn's.

Em relação ao tempo de permanência nas diferentes áreas do campo aberto, pode-se observar influência da idade ($F=8,49$, $p < 0,001$) e da área estudada ($F=217,28$, $p < 0,001$), além da existência de interação idade x área ($F=89,70$, $p < 0,001$). Houve diminuição do tempo de permanência na área central até o P17, com diferença entre o P8 e P14, P14 e P17 ($p < 0,001$) (Fig. 6). O tempo de permanência na área intermediária aumentou entre P8 e P14 ($p < 0,001$), diminuindo em P17, em relação a P14 ($p < 0,001$) (Fig. 6). Na área periférica, houve aumento do tempo de permanência até P17 ($p < 0,001$), seguido por redução em P21 ($p < 0,001$) (Fig. 6). No estudo pelas idades, a permanência dos animais na área central foi maior comparada às duas outras áreas, em P8 ($p < 0,001$) (Fig. 6). Em P14, o tempo na área periférica diferiu apenas da área intermediária, apresentando-se aumentado ($p < 0,001$) (Fig. 6). Em todas as outras idades estudadas, os animais permaneceram mais tempo na área periférica ($p < 0,001$), não havendo diferenças entre o tempo de permanência nas áreas central e intermediária (Fig. 6).

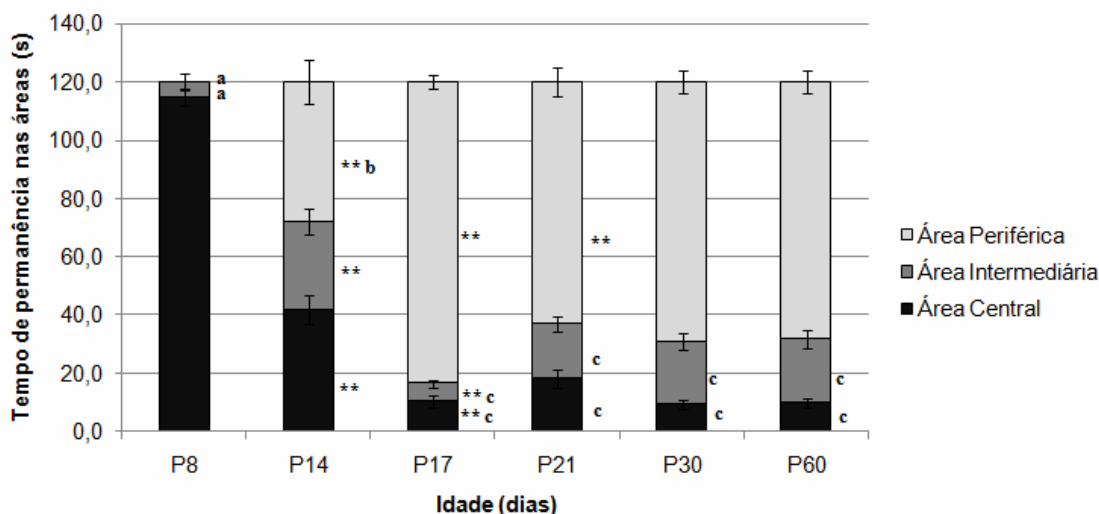


Figura 6 – Desenvolvimento do tempo de permanência nas áreas do campo aberto. Ratos normais (n=19) foram avaliados em campo aberto, nas idades apresentadas, durante dois minutos. Valores em média $\pm$ EPM. ** $p < 0,001$, mesma área vs. idade anterior. **a, b, c** $p < 0,001$, vs. área na mesma idade (a, área central; b, área intermediária; c, área periférica). Anova two way para medidas repetidas, pós-teste Tukey. $F_{\text{idade}} = 8,49$, $p < 0,001$; $F_{\text{área}} = 217,28$, $p < 0,001$; $F_{\text{idade} \times \text{área}} = 89,70$, $p < 0,001$

4 Discussão

Neste trabalho, apresentamos um sistema automático de análise da locomoção, para roedores. Este sistema foi capaz de analisar todos os parâmetros desejados, utilizando os mesmos algoritmos para todas as análises, e de forma quase independente do pesquisador. Este era responsável apenas pela criação da máscara, para isolamento do campo aberto, e por alimentar o sistema com informações sobre o animal e sobre o processo de conversão do vídeo em quadros. Para testar o sistema, analisamos o desenvolvimento da locomoção, em ratos normais. Os resultados obtidos estão em acordo com dados disponíveis na literatura sobre o padrão desenvolvimento de atividade locomotora, para as idades e animais estudados.

Altman e Sudarshan (1975) observaram o desenvolvimento motor de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus*), submetidos ao teste em campo aberto, de P1 a P21. Estes autores realizaram análise dos aspectos qualitativos da locomoção. Apesar de terem observado diferenças no decorrer do desenvolvimento, não puderam estabelecer valores que pudessem ser comparados a outros trabalhos. Além disso, a observação apresentava-se algo subjetiva. Westerga e Gramsbergen (1990) estudaram o desenvolvimento da locomoção, em ratos, de P10 a P20. Diferentemente dos primeiros, estes autores utilizaram a análise de imagens do caminhar dos animais, sobre um corredor, para o estudo da locomoção. Eles foram capazes de realizar análise qualitativa, quantitativa e cinemática do caminhar.

Entretanto, não puderam avaliar as diferenças comportamentais apresentadas pelos animais durante o desenvolvimento. Ademais, a exposição desses a um corredor, limitava a apresentação da locomoção espontânea. Nosso trabalho, assim como os citados, foi capaz de evidenciar as mudanças na locomoção, decorrente do seu desenvolvimento. Observamos um início (P8) de menor atividade, estabilizando-se o padrão em P17, evoluindo posteriormente quanto às questões comportamentais e melhora do desempenho físico. Ao contrário do trabalho de Westerga e Gramsbergen (1990), o nosso não nos permitiu analisar o ciclo da marcha, mas nos permitiu verificar o desempenho global do animal, pelos parâmetros de distância percorrida, velocidade e potência média. Além disso, o campo aberto oferece a possibilidade de locomoção mais livre para o animal, que se movimenta espontaneamente sobre este.

Mais recentemente, novos sistemas de análise da locomoção foram desenvolvidos. Alguns realizam a análise da locomoção a partir da interrupção de feixes de luz infravermelha, e expressam seus resultados na forma de contagem das vezes em que a luz foi interrompida, considerada locomoção horizontal (Bâ e Seri, 1995; Siemiatkowski et al., 2000; Bellinger et al., 2006). Neste tipo de análise, algumas vezes, também é incluído o estudo dos movimentos na direção vertical (Bellinger et al., 2006). No presente trabalho, não pudemos calcular a atividade do animal na direção vertical, mas, por outro lado, podemos, de forma mais exata, quantificar os movimentos horizontais.

Outros sistemas de análise utilizam, assim como o apresentado, imagens de vídeo para extração dos parâmetros de estudo (Sams-Dodd, 1995; Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). Alguns necessitam que imagens gravadas inicialmente em modo analógico sejam digitalizadas, para posterior análise (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). Isso, muitas vezes, ocasiona perda da qualidade do vídeo, com aparecimento de ruídos que podem interferir na extração dos dados (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). Por este motivo, nossas aquisições foram realizadas por uma câmera de vídeo diretamente no modo digital, não existindo o armazenamento analógico.

A maioria dos sistemas que trabalham com imagens digitais utiliza a distinção de cor para diferenciar o animal estudado do aparato (Sams-Dodd, 1995; Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001). Em nosso sistema, utilizamos a diferenciação da intensidade de pixels entre branco e preto. Para aumentar o contraste entre o rato e o campo aberto, todo o campo apresentava a cor preta. Alguns autores utilizam iluminação indireta para isto, entretanto esta técnica pode influenciar o comportamento desenvolvido (Kulikov, Tikhonova, Kulikov, 2008). Nos trabalhos em que são utilizados mais de um animal por teste, é comum tingir um dos

animais para diminuir sua área corporal e diferenciá-lo do outro, que participa do mesmo teste (Sams-Dodd, 1995; Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001; Sustr et al., 2001). Em nosso sistema, demos prioridade ao estudo individual dos animais, excluindo interferência de comportamentos de interação sobre a expressão da locomoção.

Em relação aos parâmetros extraídos das imagens, há grande variação entre os diversos trabalhos. De forma geral, a maioria apresenta a distância percorrida (Sams-Dodd, 1995; Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001; Kulikov, Tikhonova, Kulikov, 2008). Outros dados, como velocidade, também podem ser incluídos (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001), e alguns utilizam a divisão do aparato em áreas para estudar o comportamento (Sams-Dodd, 1995; Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001).

No presente sistema, apresentamos dois tipos de abordagens sobre a locomoção: a biomecânica e a comportamental. A primeira foi expressa a partir de parâmetros como distância percorrida, velocidade média e potência média. Nestes, buscamos exprimir como se apresentava a capacidade mecânica do animal em deslocar-se. Ao estudar o animal por diferentes fases da vida e confrontarmos os achados com dados da literatura, pudemos observar que sua capacidade de gerar movimento está ligada ao nível de maturação, ativação e coordenação das estruturas neurais (sensoriais e motoras) (Vinay et al., 2002), e, principalmente, à ativação muscular (Gramsbergen, 1998). Para a análise comportamental, utilizamos o estudo do tempo e número de paradas e sua relação, além da distribuição do animal pelas áreas campo aberto. Nesses aspectos, nossos resultados estão em acordo com o disposto na literatura sobre o aumento da atividade exploratória e da interação com o meio, entre o desmame e o 30º dia pós-natal (Bâ e Seri, 1995).

A possibilidade de extrair parâmetros biomecânicos e comportamentais em um mesmo teste é útil, pois nos permite uma visão mais ampla sobre a locomoção, visto que o comportamento é influenciado pela capacidade em gerar movimento e vice-versa (Prut e Belzung, 2003). Por exemplo, ao estudarmos o tempo de permanência nas áreas pudemos observar que o tempo gasto em P8 na área periférica foi muito pequeno em relação às outras idades. Porém, mais do que representar um comportamento menos ansioso do animal (Prut e Belzung, 2003), isto representa a incapacidade deste em deslocar-se até áreas mais externas, decorrente da imaturidade de seu controle muscular e maturação neural (Gramsbergen, 1998; Vinay et al., 2002). No outro sentido, algumas drogas, que atuam sobre o comportamento emocional, podem alterar o deslocamento dos animais, mesmo sem agirem diretamente sobre o sistema muscular (Sams-Dodd, 1995; Siemiakowski et al., 2000).

O sistema de análise apresentado mostrou-se uma ferramenta útil para o estudo da locomoção, apresentando baixo custo para sua implantação. Por ser um sistema automático, necessita de pouco tempo para análise, não sofre influência do pesquisador em seus resultados, permitindo alta reprodutibilidade e confiabilidade nos dados. Ademais, é capaz de evidenciar alterações na atividade locomotora, podendo ser empregado em diversos estudos sobre o tema.

5 Referências Bibliográficas

Altman J, Sudarshan K., Postnatal development of locomotion in the laboratory rat, *Anim Behav.*1975;23:896-920.

Bâ A, Seri BV. Psychomotor functions in developing rats: ontogenetic approach to structure-function relationships. *Neurosci Biobehav. Rev.* 1995;19(3):413-25.

Barros KMFT, Manhães-De-Castro R, Sousa SL, Matos RJB, Deiró TCBJ, Cabral-Filho JE, Canon F. A regional model (Northeast Brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutrit Neurosci.* 2006;9:99-104.

Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma.* 2006;23(5):635-59.

Bellinger L, Sculley DV, Langley-Evans SC. Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. *Int J Obes (Lond).* 2006;30(5):729-38.

Gramsbergen A. Posture and locomotion in the rat: independent or interdependent development? *Neurosci Biobehav Rev.* 1998;22:547-53.

Hall C.S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 1934;18:385– 403.

Kulikov AV, Tikhonova MA, Kulikov VA. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. *J Neurosci Met.* 2008;170:345–51.

Noldus LPJJ, Spink AJ, Tegelenbosch RAJ. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav Res Met Instr Comp.* 2001;33(3):398-414.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463:3-33.

Sams-Dodd F. Automation of the social interaction test by a video-tracking system: behavioural effects of repeated phencyclidine treatment. *J Neurosci Met.* 1995;59:157-67.

Siemiątkowski M, Sienkiewicz-Jarosz H, Członkowska AI, Bidziński A, Płaźnik A. Effects of buspirone, diazepam, and zolpidem on open field behavior, and brain [3H]muscimol binding after buspirone pretreatment. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;66(3):645-51.

Sustr P, Spinka M, Cloutier S, Newberry RC. Computer-aided method for calculating animal configurations during social interactions from two-dimensional coordinates of color-marked body parts. *Behav Res Methods Instrum Comput.* 2001;33(3):364-70.

Vinay L, Brocard F, Clarac F, Norreel J, Pearlstein E, Pflieger JF. Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. *Brain Res Rev.* 2002;40:118-29.

Westerga J, Gramsbergen A. The development of locomotion in the rat. *Dev Brain Res.* 1990;57:163-74.

Artigo original 2

Tratamento neonatal com agonista 5-HT_{1A}: influência sobre o desenvolvimento da locomoção e programação da resposta aguda à bupiriona.

Resumo

O sistema serotoninérgico está relacionado à regulação de diversas funções, dentre elas encontra-se a locomoção. Sugere-se que, nesta função, sua atuação seja intermediada via receptores 5-HT_{1A}. Neste trabalho, investigamos a influência da administração crônica de bupiriona (agonista parcial 5-HT_{1A}) sobre o desenvolvimento da locomoção e a possibilidade de programar a resposta à manipulação aguda. Filhotes machos de ratos *Wistar* receberam bupiriona nas doses 2,5 (n=13), 5 (n=13) e 10 (n=13) mg/Kg, ou salina (n=14, NaCl 0,9%), ambos via subcutânea, de P1 a P21. A atividade locomotora foi avaliada em P8, P14, P17, P21, P30 e P60, durante 2 minutos, no teste de campo aberto. Em P70, os animais receberam dose de bupiriona 5mg/Kg, e após 30 minutos, foram submetidos novamente ao teste. Em todas as avaliações foram analisados: distância percorrida, velocidade média, potência média, tempo de imobilidade, número de parada, relação tempo/número de parada e tempo de permanência nas áreas do campo. O tratamento neonatal reduziu a potência média, em P60, e alterou a evolução dos parâmetros número de paradas e relação tempo de imobilidade/número de parada, nas doses mais baixas, durante o desenvolvimento. A administração aguda de bupiriona reduziu a atividade locomotora, em todos os animais, indicando um possível efeito sedativo da droga. Entretanto, o grupo que recebeu a dose mais alta de bupiriona durante o aleitamento, essa redução foi menor. A manipulação neonatal, com bupiriona, altera alguns parâmetros da atividade locomotora e modifica a resposta aguda ao fármaco, sugerindo ocorrência de programação.

Palavras-chaves: desenvolvimento, programação, bupiriona, locomoção

1 Introdução

Estudos epidemiológicos e experimentais têm evidenciado correlação entre modificações do ambiente pré- e pós-natal e surgimento de doenças ou respostas fisiológicas alteradas, na vida adulta (Hales e Barker, 1992; Barreto-Medeiros et al., 2002; Lopes de Souza et al., 2008). Alterações permanentes na estrutura e função do organismo, mecanismo conhecido como programação, poderiam explicar essa correlação (Lucas, 1991). As alterações prejudicariam a capacidade do organismo em responder a mudanças adaptativas, por vezes necessárias, predispondo-o a doenças (Hales e Barker, 1992). Manipulações adversas, no período crítico do desenvolvimento, podem ocasionar alterações permanentes na locomoção, apresentando modificações na marcha, postura, entre outros (Walton, 1992; Myoga et al., 1995; Pflieger, Clarac e Vinay, 2002).

Neurotransmissores, como a serotonina (5-HT), estão relacionados com diversas etapas do desenvolvimento, atuando em vários sistemas (Lauder, 1988). A 5-HT está envolvida na regulação de diversos comportamentos e funções fisiológicas, como sono, locomoção, ingestão alimentar, termorregulação, humor e estresse (Halford e Blundell, 1996; Imeri et al., 1999; Jacobs e Fornal, 1999). Em relação à locomoção, sabe-se que as projeções serotoninérgicas alcançam a medula espinhal no 14º dia embrionário (E14), sendo uma das primeiras vias descendentes na região (Rajaofetra et al., 1989; Clarac et al., 1998), servindo como sinal para diferenciação e estabilização para diversas populações neuronais, que se projetarão para a medula durante o desenvolvimento (Jacobs e Fornal, 1997). A aplicação de 5-HT em preparados de medula espinhal isolada de ratos é capaz de evocar padrão de atividade motora semelhante aquele apresentado durante locomoção normal, chamado de locomoção fictícia, em fetos (Iizuka, Nishimaru e Kudo, 1998; Nakayama, Nishimaru e Kudo, 2001) e neonatos (Cazalets, Sqalli-Houssaini e Clarac, 1992; Ballion, Morin e Viala, 2001). Induzindo ritmicidade e ativação tônica (Ballion, Morin e Viala, 2001), desempenhando importante papel nas propriedades de disparo dos motoneurônios (Pflieger, Clarac e Vinay, 2002). Liberação de 5-HT pelo corno dorsal da medula parece modular a locomoção atuando, principalmente, nos motoneurônios (Gerin et al., 2008). Alteração nas concentrações de 5-HT, através de manipulações farmacológicas, durante período de desenvolvimento, induz atraso no desenvolvimento somático, reflexo e da atividade locomotora (Myoga et al., 1995; Borella, Bindra e Whitaker-Azmitia, 1997; Pflieger, Clarac e Vinay, 2002; Deiró et al., 2006).

Entre os receptores serotoninérgicos, o receptor 5-HT_{1A} é muito conhecido e caracterizado (Barnes e Sharp, 1999). Este receptor parece estar relacionado, de alguma forma, com a regulação da atividade locomotora (Wallis, 1994). Os geradores de padrão central (do inglês, central pattern generator – CPG), localizados na medulas espinhal e que geram a locomoção fictícia, parecem ser regulados pelos receptores 5-HT_{1A} (Wallis, 1994). Administração de crônica de agonistas 5-HT_{1A}, em ratos com lesão medular, resulta na melhora da função motora, porém esses efeitos desaparecem após o término do tratamento (Antri et al., 2003; Bravo et al., 2007). Alguns estudos demonstram que a estimulação dos receptores 5-HT_{1A} diminui a atividade locomotora (Angrini, Leslie e Shephard, 1997; Pruus et al., 2000; Majercsik et al., 2003; Eskow et al., 2007), enquanto outros relatam que aumenta (Evenden, 1994; Borella, Brinda e Whitaker-Azmitia, 1997). Estudo com administração, no período pré-natal, de buspirona evidenciou efeitos benéficos deste sobre a locomoção, quando sua administração estava associada à existência de evento estressor (Nishio et al., 2001). A

variedade na resposta motora a manipulações dos receptores 5-HT_{1A}, em animais, parece depender da dose utilizada, da duração e idade na qual o tratamento foi realizado (Geyer, 1996; Borella, Bindra e Whitaker-Azmitia, 1997).

A partir de observações experimentais da influência da utilização de agonista do receptor 5-HT_{1A} sobre o desenvolvimento somático e reflexo, indagamos se não haveria também interferência sobre o desenvolvimento da locomoção. Além disso, questionou-se se a manipulação precoce poderia programar a resposta à administração aguda do mesmo fármaco. Para tal estudo, utilizamos, no presente trabalho, bupirona, um agonista parcial 5-HT_{1A}/antagonista D2 (Carli, Prontera e Samanin, 1989). A manipulação farmacológica foi realizada durante todo o período de aleitamento. Em vista da importância desta fase para o desenvolvimento da locomoção – período onde ocorre a maturação das projeções descendentes, aumento do tônus muscular e do controle da musculatura de tronco e membros (Westerga e Gramsbergen, 1990; Gramsbergen et al., 1999; Vinay, Brocard e Clarac, 2000). Além disso, foi investigada a ação da administração aguda de bupirona sobre a locomoção, em animais adulto-jovens.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais

Ratos da linhagem Wistar, provenientes do biotério de criação do Departamento de Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco – Brasil, foram acasalados para obtenção de ninhadas. Os animais eram mantidos em um ambiente com controle de temperatura (22°C ± 2°C) e luz (21:00 às 9:00 acesas). Um dia após o nascimento, os neonatos machos foram separados das respectivas mães para serem pesados e distribuídos, equitativamente, entre os grupos experimentais. O dia do nascimento foi considerado dia pós-natal 0 (P0). As ninhadas eram constituídas pela mãe e oito filhotes. A partir do 21º dia pós-natal (P21), os filhotes foram separados das mães (desmame), ficando em gaiolas conjuntas, com no máximo quatro animais, até o final dos experimentos. Os animais tinham livre acesso à água filtrada e dieta padrão do biotério (ração LABINA - Purina do Brasil, contendo 23% de proteína). O peso dos filhotes foi aferido de P1 a P21 e em P30, P40, P50, P60, P69 e P70. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pernambuco e seguem as recomendações do National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

2.2 Tratamento farmacológico e grupos experimentais

Todos os animais receberam diariamente, do P1 a P21, injeção subcutânea de: bupiriona (nas doses 2,5, 5 ou 10 mg/Kg, n=13 para cada dose) ou salina (NaCl, 0,9%, n=14), todas num volume de 1ml/100g de peso corporal. Em P70, todos os animais receberam injeção aguda de bupiriona (5mg/Kg), via intraperitoneal, no mesmo volume descrito anteriormente. Bupiriona, obtida na forma de sal (Vico-farma, Brasil), foi dissolvida em salina. As manipulações ocorreram entre 12:00 e 14:00h.

2.3 Registro da atividade locomotora

Os animais foram retirados das gaiolas e colocados em um campo aberto circular ($\varnothing$ 1m), delimitado por paredes de 30 cm de altura, com paredes e fundo pretos. O animal locomovia-se livremente no campo, enquanto uma câmera digital fixada no teto da sala registrava seus movimentos.

Em P8, P14, P17, P21, P30 e P60, os animais foram filmados durante dois minutos. Nas quatro primeiras idades, avaliação da locomoção ocorreu antes do tratamento farmacológico do dia. Em P69 e P70, o registro durou 10 minutos, e em P70 ocorreu 30 minutos após a aplicação de bupiriona. As filmagens foram realizadas entre 12:00 e 14:00h. Após cada animal, o campo aberto foi limpo com solução de água e hipoclorito, para evitar influência de estimulação olfatória.

2.4 Análise da atividade locomotora

O registro da trajetória foi enviado ao computador através de uma interface, sendo convertido em quadros para processamento. Através de técnicas de processamento digital de imagens, cada quadro foi filtrado de forma a isolar o campo dos objetos que estão no entorno. Em seguida foram determinadas as coordenadas da posição do animal, em cada quadro, reconstruindo sua trajetória. De posse da trajetória, do número e do intervalo de tempo entre os quadros, e da massa do animal foram calculados os seguintes parâmetros: distância percorrida, velocidade média ($\Delta S/\Delta T$), potência média ($mV^2/2\Delta T$), tempo de imobilidade, número de paradas, relação tempo de imobilidade/número de paradas e tempo de permanência em cada área do campo (Fig.1). De todos os vídeos provenientes das filmagens foram extraídos esses parâmetros. O conjunto dos parâmetros avaliados foi considerado para estudo da atividade locomotora.

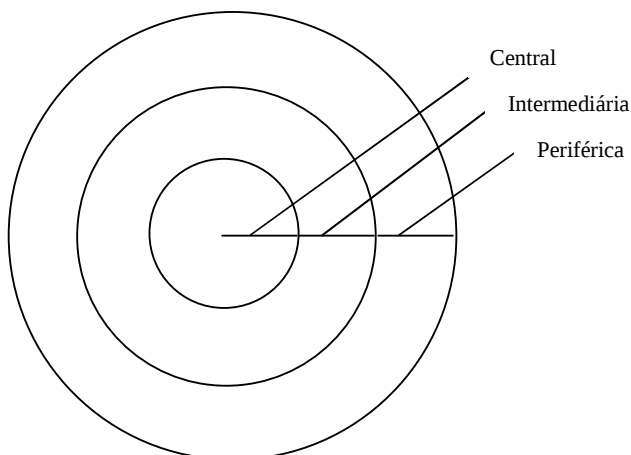


Figura 1: Representação das áreas, virtualmente criadas, para análise do tempo gasto pelos animais em cada região do campo. As áreas apresentavam raios de 0,165, 0,33, 0,5 metros, (área central, intermediária e periférica, respectivamente).

2.5 Análises estatísticas

Anova one way medidas repetidas foi aplicado para parâmetro de peso, pós-teste Tukey. Para estudo da atividade locomotora, nos parâmetros distância percorrida, velocidade média, potência média, tempo de imobilidade, número de paradas e tempo de permanência nas áreas, foi utilizado Anova two way (dose x idade) para medidas repetidas, teste de Tukey como pós-teste. Para a relação tempo de imobilidade/número de paradas foi utilizado Friedman, pós-teste Dunn's. Para avaliação da resposta aguda à buspirona, utilizou-se o teste T pareado (intragrupo), e Anova one-way (intergrupo), pós-teste Tukey. Exceto para a relação tempo de imobilidade/número de paradas, onde se utilizou os testes Wilcoxon Signed Rank (intragrupo) e Kruskal-Wallis (intergrupo), assim como o teste de Dunn's como pós-teste. Nível crítico de significância de 0,05 sempre foi considerado. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

3 Resultados

Em relação à evolução ponderal, pudemos observar uma diminuição ($p < 0,05$) da massa corporal, nos animais tratados com buspirona em relação ao grupo Salina, em P14, P17 e P21. Este efeito ocorreu em todas as doses utilizadas (Fig. 2).

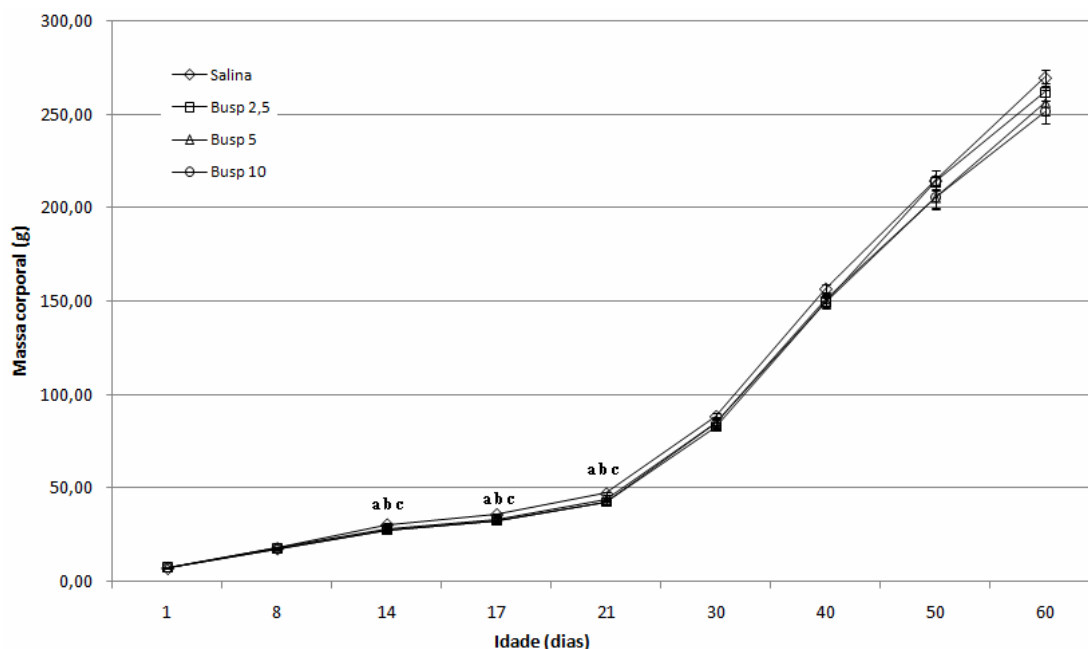


Figura 2. Efeito do tratamento neonatal com bupiriona sobre a massa corporal (g). Do 1º ao 21º dia pós-natal, ratos Wistar receberam injeções de bupiriona, nas doses 2,5 (n=13), 5 (n=13), 10 (n=13) mg/Kg ou solução salina (n=14). Valores expressos em média $\pm$ EPM. **a, b, c** = $p < 0,05$ (a, Busp 2,5 vs. Salina; b, Busp 5 vs. Salina; c, Busp 10 vs. Salina), Anova one way medidas repetidas, pós-teste Tukey.

Para o estudo do desenvolvimento da locomoção, no parâmetro de distância percorrida, foi observado efeito principal da idade ($F=211,24$; $p<0,001$), porém não houve efeito da dose ($F=2,73$; $p=0,053$), nem interação entre dose e idade ($F=1,25$; $p=0,23$). Em relação à idade, houve aumento significativo da distância, comparada à idade anterior, em P14 ($p<0,001$), P17 ($p<0,001$), P21 ($p<0,001$) e P30 ($p<0,001$). Em P60, foi verificada redução ($p<0,001$) neste parâmetro em relação a P30 (Fig. 3A). Na velocidade média, houve efeito da idade ($F=827,43$; $p<0,001$), da dose ($F=3,05$; $p=0,04$) e não houve interação dose x idade ($F=1,54$; $p=0,09$). Houve aumento progressivo da velocidade média, com diferença entre todas as idades estudadas para todos os grupos ($p<0,01$) (Fig. 3B). Para a potência média, foi observado efeito da idade ($F=1470,72$; $p<0,001$), da dose ($F=3,18$, $p=0,03$) e interação dose x idade ($F=2,04$; $p=0,01$). Todos os grupos apresentaram aumento da potência média, em P30 e P60, comparada a P21 e P30, respectivamente ($p<0,001$). A potência média foi menor em todos os grupos Busp quando comparados ao grupo Salina, em P60 ($p<0,001$) (Fig. 3C).

O tempo de imobilidade dos animais no campo aberto evoluiu de forma semelhante em todos os grupos analisados. Houve apenas influência da idade ($F=127,72$; $p<0,001$), neste parâmetro. Não houve efeito da dose ($F=2,04$; $p=0,12$) ou interação dose x idade ($F=1,31$; $p=0,20$). O tempo de imobilidade foi menor em P14 ($p<0,001$) e P17 ($p<0,001$), e maior em

P60 ($p < 0,001$), em relação às idades anteriores (Fig. 3D). Para o parâmetro número de paradas, foi observado efeito da idade ($F=23,01$; $p < 0,001$) e interação dose x idade ($F=2,38$; $p=0,003$). Não houve efeito da dose isoladamente ($F=0,91$; $p=0,44$). Nos animais dos grupos Salina e Busp10, foi observado aumento do número de paradas em P14 ($p < 0,001$) e diminuição em P17 ($p < 0,04$), quando comparados as idades anteriores (Fig. 3E). Na relação tempo de imobilidade/número de paradas, foi encontrada apenas diminuição desta em P14 ($p < 0,05$), quando comparado a P8, nos grupos Salina e Busp10. Nos outros grupos e idades não foram observadas diferenças (Fig. 3F).

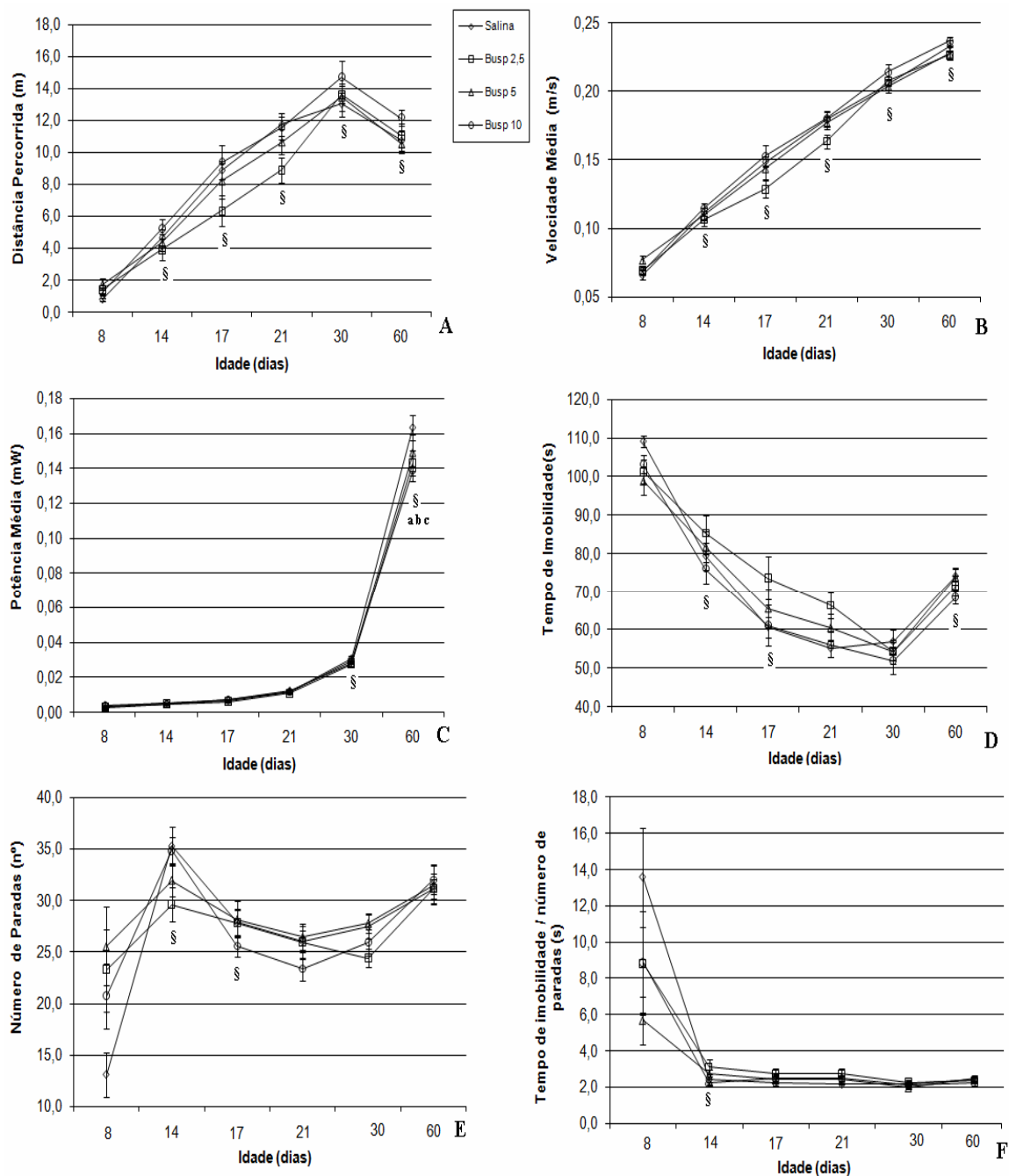


Figura 3. Efeito do tratamento neonatal com agonista 5-HT_{1A} sobre os parâmetros da atividade locomotora. Do 1º ao 21º dia pós-natal, ratos Wistar receberam injeções de bupiriona, nas doses 2,5 (n=13), 5 (n=13), 10 (n=13) mg/Kg ou solução salina (n=14). Nas idades indicadas, os animais foram avaliados por dois minutos no campo aberto. A, Distância Percorrida (m); B, Velocidade Média (m/s); C, Potência Média (mW); D, Tempo de Imobilidade (s); E, Número de Paradas (n°), Anova two-way medidas repetidas, seguido de Tukey. F, Tempo de imobilidade/número de paradas (s), Friedman, seguido de Dunn's. **a, b, c** = $p < 0,05$ (a, Busp 2,5 vs. Salina; b, Busp 5 vs. Salina; c, Busp 10 vs. Salina), § = $p < 0,05$ (vs. idade anterior). Em E e F, diferença apenas nos grupos Salina e Busp10. Valores expressos em média $\pm$ EPM. Distância Percorrida – $F_{idade} = 211,24$; $p < 0,001$; $F_{dose} = 2,73$; $p = 0,053$; $F_{idadexdose} = 1,25$; $p = 0,23$; Velocidade Média – $F_{idade} = 827,43$; $p < 0,001$; $F_{dose} = 3,05$; $p = 0,04$; $F_{idadexdose} = 1,54$; $p = 0,09$; Potência Média – $F_{idade} = 1470,72$; $p < 0,001$; $F_{dose} = 3,18$; $p = 0,03$; $F_{idadexdose} = 2,04$; $p = 0,01$; Tempo de Imobilidade – $F_{idade} = 127,72$; $p < 0,001$; $F_{dose} = 2,04$; $p = 0,12$; $F_{idadexdose} = 1,31$; $p = 0,20$; Número de Paradas – $F_{idade} = 23,01$; $p < 0,001$; $F_{dose} = 0,91$; $p = 0,44$; $F_{idadexdose} = 2,38$; $p = 0,003$.

Em P70, foi avaliada influência da administração aguda sobre a locomoção e a possível ocorrência de programação a essa resposta, em decorrência do tratamento neonatal com o mesmo fármaco. Em relação às análises pré-tratamento, os grupos tratados com buspirona no período neonatal não diferiram do grupo tratado com salina, em todos os parâmetros analisados (distância percorrida: $p=0,56$; velocidade média: $p=0,06$; potência média: $p=0,05$; tempo de imobilidade: $p=0,27$; número de paradas: $p=0,98$; relação tempo de imobilidade/número de paradas: $p=0,33$). Nas análises pós-tratamento agudo com buspirona 5mg/Kg, foi observado que a distância percorrida pelos animais que receberam buspirona 10mg/Kg, durante o período neonatal, foi maior em relação aos animais tratados com salina, ($p=0,03$), não havendo diferença em relação aos outros grupos ($p\geq 0,05$). Nos outros parâmetros avaliados pós-tratamento, os grupos não diferiram entre si (velocidade média: $p=0,22$; potência média: $p=0,22$; tempo de imobilidade: $p=0,08$; número de paradas: $p=0,16$; relação tempo de imobilidade/número de paradas: $p=0,16$) (Fig. 4).

Quando comparamos os valores das análises pré-tratamento com aqueles das análises pós-tratamento, observamos redução da distância percorrida ($p<0,001$) e aumento da potência média ($p<0,001$) em todos os grupos. A administração aguda de buspirona 5mg/Kg reduziu a velocidade média em todos os grupos ($p<0,05$), exceto no grupo tratado com buspirona 5mg/Kg no período neonatal ($p=0,052$). Na análise pós-tratamento, o tempo de imobilidade no campo aberto ($p<0,001$) e a relação tempo de imobilidade/número de paradas ($p<0,001$) foram maiores, para todos os grupos, em relação aos valores pré-tratamento. O número de paradas diminuiu na análise pós-tratamento, em relação à pré-tratamento, para todos os grupos ($p<0,001$) (Fig 4).

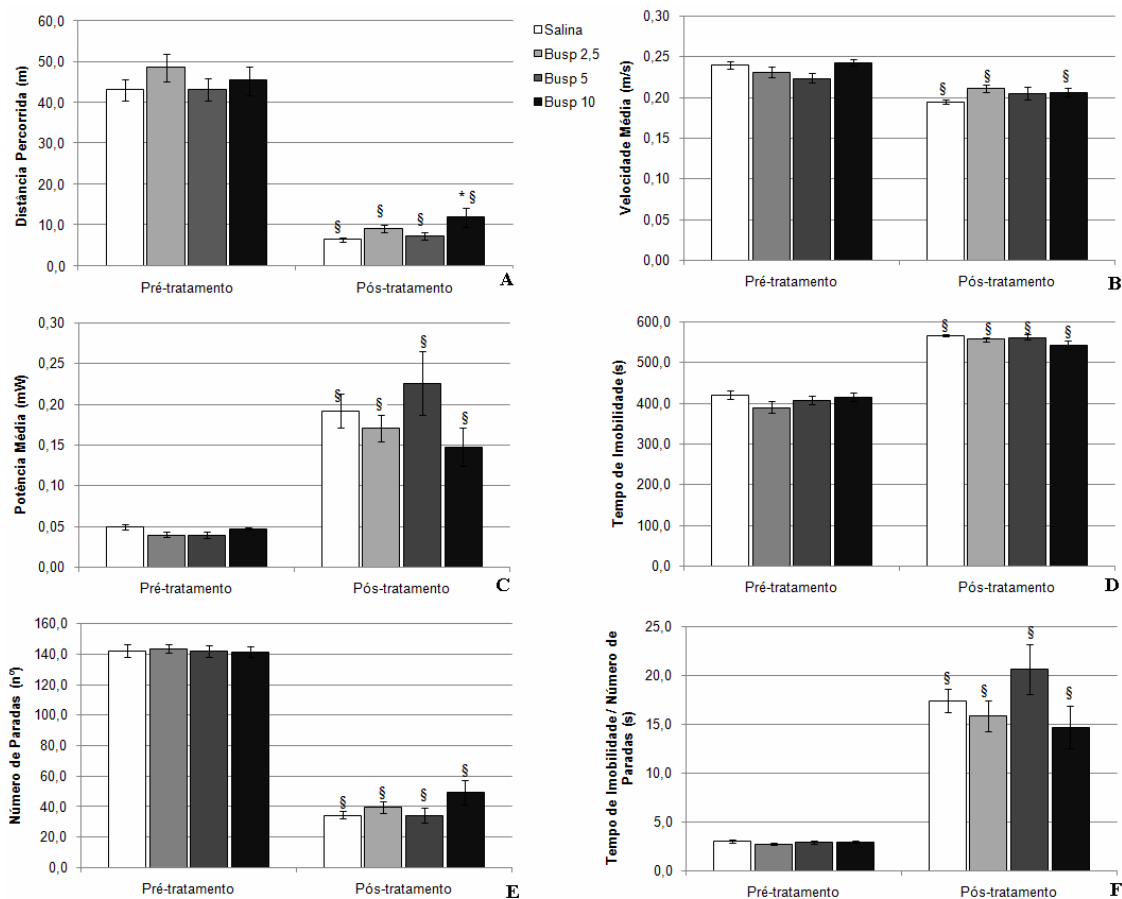


Figura 4. Efeito da administração aguda de bupiriona sobre os parâmetros da atividade locomotora. Do 1º ao 21º dia pós-natal, ratos Wistar receberam injeções de bupiriona, nas doses 2,5 (n=13), 5 (n=13), 10 (n=13) mg/Kg ou solução salina (n=14). Aos 69 dias, foram avaliados por 10 minutos no campo aberto (pré-tratamento). No dia seguinte, receberam injeção de bupiriona 5mg/Kg, i.p, após 30 minutos, foram avaliados por 10 minutos no campo aberto (pós-tratamento). A, Distância Percorrida (m); B, Velocidade Média (m/s); C, Potência Média (mW); D, Tempo de imobilidade (s); E, Número de paradas (n°), * = $p < 0,05$ (vs. Salina, Anova one way, seguido de Tukey), § = $p < 0,05$ (vs. Pré-tratamento, teste t pareado). F, Tempo /número de paradas (s), § = $p < 0,05$ (vs. Pré-tratamento, Wilcoxon Signed Rank). Valores expressos em média ± EPM.

Na análise do tempo gasto pelos animais em cada área do campo, pode-se observar o tratamento neonatal não interferiu neste parâmetro em nenhuma das avaliações ($p \geq 0,05$). Também em relação a este parâmetro, todos os grupos apresentaram redução no tempo de permanência na área central ($p < 0,001$) e na intermediária ($p < 0,001$), e aumento no tempo na área periférica ($p < 0,001$), quando comparados os valores pós-tratamento com os pré-tratamento (Fig. 5).

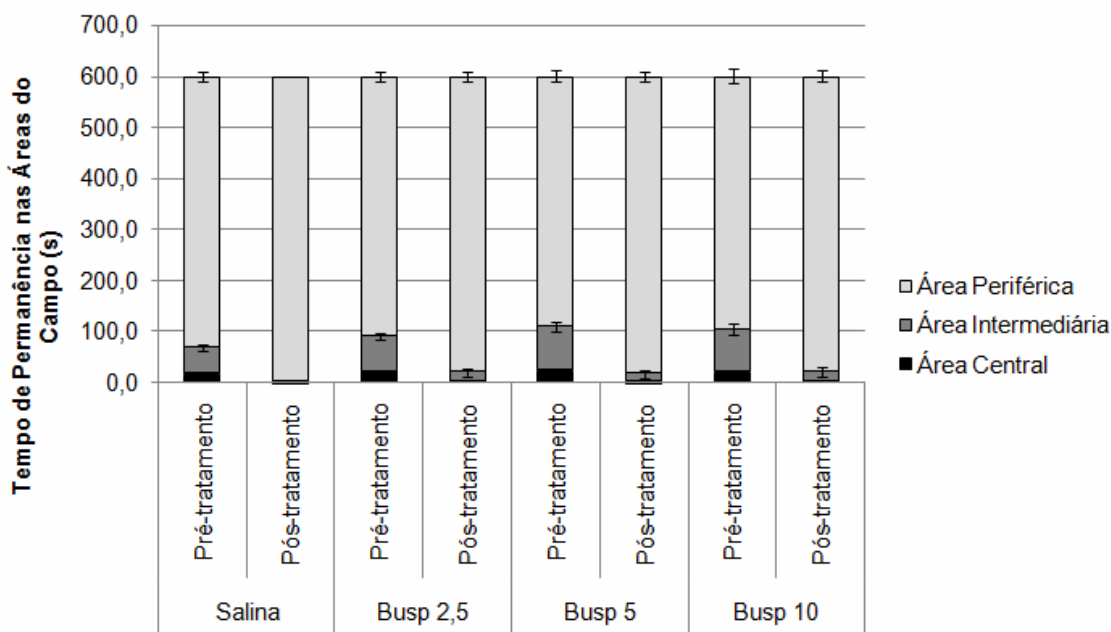


Figura 5. Efeito da administração aguda de bupirone sobre o tempo de permanência em cada área do campo aberto. Do 1º ao 21º dia pós-natal, ratos Wistar receberam injeções de bupirone, nas doses 2,5 (n=13), 5 (n=13), 10(n=13) mg/Kg ou solução salina (n=14). Aos 69 dias, foram avaliados por 10 minutos no campo aberto (pré-tratamento). No dia seguinte, receberam injeção de bupirone 5mg/Kg, i.p, após 30 minutos, foram avaliados por 10 minutos no campo aberto (pós-tratamento). Valores expressos em média $\pm$ EPM. No estudo intragrupo (Pós-tratamento vs. Pré-tratamento, para mesma área), todos os valores diferiram ($p < 0,05$, Wilcoxon Signed Rank) (marcadores omitidos). Na análise vs. Salina não houve diferença.

4 Discussão

De forma geral, nossos achados demonstram que a administração crônica de bupirone, durante o período de aleitamento, ocasiona redução da massa corporal ainda durante o aleitamento e redução da potência média, em P60. Ademais, altera a evolução da característica de número de paradas e relação tempo de imobilidade/número de parada, nas primeiras semanas de vida. A administração aguda de bupirone, em animais adulto-jovens, reduz a distância percorrida, velocidade média e número de paradas, além de aumentar a potência média, tempo de imobilidade e relação tempo de imobilidade/número de paradas, avaliados pelo teste em campo aberto. Após injeção aguda de bupirone, a distância percorrida pelos animais que haviam recebido bupirone 10mg/Kg, no período neonatal, foi maior que aquela do grupo que recebeu salina, no mesmo período.

Neste trabalho, houve redução do ganho de massa, da segunda à terceira semana de vida, nos animais tratados com bupirone. A 5-HT apresenta influência sobre a ingestão alimentar, o que pode alterar o ganho ponderal (Halford e Blundell, 1996). Administração crônica de agonistas 5-HT_{1A} aumenta a liberação de 5-HT (Riad et al., 2001; Blier e Ward,

2003). Este aumento ocasionaria diminuição da ingestão alimentar e, conseqüentemente, do ganho ponderal, explicando o efeito observado no presente trabalho.

No presente trabalho, os animais tratados com bupirone, nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg, no período neonatal, não apresentaram a mesma evolução dos animais controle nos parâmetros de número de paradas e relação tempo de imobilidade/número de parada. Isto representa que o nível de atividade destes animais não diferiu com o desenvolvimento. A observação de que doses mais baixas de bupirone apresentaram resposta diferente da apresentada pela dose mais alta, está relacionada ao efeito bifásico ou em forma de U que este fármaco apresenta (McNaughton, Panickar, Logan, 1996; Wisłowska-Stanek et al., 2005; Auclair et al., 2007). Isto pode ser explicado pelo fato da bupirone ser um agonista parcial dos receptores 5-HT_{1A}, e também interagir com receptores dopaminérgicos (Carli, Prontera e Samanin, 1989).

Em todas as doses utilizadas, a potência média produzida, em P60, foi menor nos grupos manipulados com bupirone no período neonatal. Neste trabalho, consideramos apenas a potência produzida a partir da energia cinética dissipada durante o tempo em que o animal permaneceu em movimento. Desta forma, os parâmetros de massa corporal, velocidade média e tempo de parada são utilizados no cálculo. Individualmente, esses valores não diferiram do grupo controle, mas, ao serem utilizados em conjunto, evidenciaram a redução. Não encontramos nenhum trabalho na literatura que tenha estudado este tipo de parâmetro. Mas, em nosso estudo, ele representa que os animais tratados com bupirone, no período neonatal, teriam uma menor capacidade em produzir movimento. Entretanto, outros estudos precisam ser realizados para maiores esclarecimentos, pois um componente comportamental (tempo de imobilidade) está incluso neste cálculo. Nos outros parâmetros avaliados, a utilização crônica de bupirone não alterou a locomoção, nem durante a administração (entre P8 e P21), nem depois de cessado o tratamento (P30 e P60).

Apesar de terem recebido injeções com droga ansiolítica (Carli, Prontera e Samanin, 1989), os animais dos grupos bupirone apresentaram distribuição mais periférica no campo, assim como os do grupo controle. Prut e Belzung (2003) mostram que a permanência nas áreas mais centrais do campo aberto seria característica de diminuição da ansiedade, efeito esperado de drogas ditas ansiolíticas. Entretanto, isso não foi observado no presente trabalho. Todavia a procura por regiões próxima a paredes está relacionada com um comportamento normal de ratos conhecido como tigmotaxia (Treit e Fundytus, 1988).

Borella, Brinda e Whitaker-Azmitia (1997), utilizando outro agonista 5-HT_{1A}, o 8-OH-DPAT, encontraram maior atividade espontânea quando a manipulação farmacológica

aconteceu entre o P10 e P17, mas não quando utilizado entre o P3 e P10 ou P17 e P24. Talvez, a ausência de alterações mais expressivas da administração de buspirona aqui apresentadas, deva-se ao uso muito prolongado (21 dias) da droga. Isto poderia ocasionar dessensibilização dos receptores 5-HT_{1A} (Riad et al., 2001; Blier e Ward, 2003) antes que esses alcançassem o período mais crítico para sua atuação sobre o comportamento locomotor.

Trabalho utilizando a depleção de 5-HT, com p-clorofenilalanina (PCA), durante o período de desenvolvimento, evidenciou importantes déficits posturais, alteração nas distâncias e velocidades desenvolvidas, e falta de coordenação entre membros (Myoga et al., 1995; Pflieger, Clarac e Vinay, 2002). Sugerindo que manipulações dos níveis globais de 5-HT e ativação de outros receptores estejam mais relacionadas com o desenvolvimento da locomoção.

Na avaliação das alterações na atividade locomotora em resposta à administração aguda de buspirona, observamos redução da atividade locomotora em todos os animais, independente do tratamento realizado no período neonatal. Esta redução foi caracterizada pela diminuição da distância percorrida, velocidade média e número de paradas, e aumento no tempo de imobilidade e na relação tempo/número de paradas.

Na direção oposta, Evenden (1994) encontrou aumento da atividade locomotora após injeção de buspirona, em cobaias, mas esta resposta foi menor quando comparada com outros ansiolíticos e foi limitada aos 30 minutos após a aplicação. Corroborando com nosso trabalho, Angrini, Leslie e Shephard (1997) encontraram redução na atividade locomotora após aplicação de buspirona, na dose de 5 mg/Kg e Nicolas, Klein e Prinssen (2007), na dose 3 mg/Kg. Aplicação de buspirona (10mg/Kg) reduziu a locomoção, em ratos, 30 minutos após sua administração, no teste com labirinto elevado em cruz (Majercsik et al., 2003). Porém, os mesmos efeitos não foram observados quando a análise foi realizadas 2 ou 4 horas após injeção (Majercsik et al., 2003). Dois fatores podem estar relacionados aos achados de redução na locomoção: efeito sedativo (Pruus et al., 2000) e liberação de glicocorticóides (Matheson et al., 1997; Haller et al., 2001).

O efeito sedativo seria mediado via antagonismo dos receptores D2 apresentado pela buspirona (Collinson e Dawson, 1997; Pruus et al., 2000; Eskow et al., 2007). Entretanto, Auclair et al. (2007) afirmam que a influência dos receptores dopaminérgicos aconteceria apenas em doses mais altas, e atuaria em oposição aos efeitos da ativação dos receptores 5-HT_{1A}, resultando numa ausência de respostas. Em relação ao segundo fator, foi evidenciado que a administração de buspirona aumenta os níveis de glicocorticóides (Matheson et al., 1997), e isto poderia contribuir para redução da locomoção (Haller et al., 2001; Majercsik et

al., 2003). Nas análises realizadas 2 ou 4h após a aplicação, não se observa redução da locomoção (Majercsik et al., 2003), pois os níveis de glicocorticóides estariam normalizados (Matheson et al., 1997; Haller et al., 2001).

O aumento da potência média, observado após aplicação aguda de bupiriona, está relacionado, em grande parte, ao aumento no tempo de imobilidade. Como foi relatado anteriormente, este parâmetro foi utilizado para o cálculo da potência. Por apresentar-se aumentado, reduziu o denominador da equação, elevando o valor da potência. Neste caso, o componente comportamental se sobressaiu aos aspectos biomecânicos, relacionados à potência produzida. Além disso, a bupiriona é considerada um ansiolítico que não apresenta influência sobre a musculatura (Tunnicliff, Eison, Taylor, 1991). Corroborando com os nossos achados de tempo de parada, Lim et al. (2008) também observaram aumento do tempo de imobilidade devido à aplicação aguda de bupiriona, em ratos.

Em relação à distribuição dos animais pelas áreas, encontramos aumento significativo no tempo gasto na área mais periférica. Isso representaria um efeito ansiogênico da droga (Prut e Belzung, 2003). Collinson e Dawson (1997) observaram efeito ansiogênico da bupiriona no teste do labirinto elevado em cruz com doses de 4mg/Kg. Esses autores sugerem que o efeito ansiolítico possa ocorrer em doses menores (Collinson e Dawson, 1997). Acreditamos que, no presente trabalho, este efeito esteja associado ao efeito sedativo. Como o animal permanecia grande tempo parado, e essas paradas aconteciam em maior número na área periférica (dados não apresentados), isto aumentou o tempo de permanência nesta área. Seriam necessários estudos posteriores para discernir qual atividade esses animais realizavam quando parados, para concluirmos realmente que se trata de efeito ansiogênico.

Após administração aguda, a distância percorrida pelos animais tratados, durante o período de aleitamento com bupiriona na dose 10mg/Kg, foi maior que daqueles tratados com salina. Este achado pode representar uma programação à resposta ao fármaco. A manipulação no período neonatal, altera a expressividade dos receptores 5-HT_{1A} (Riad et al., 2001; Blier e Ward, 2003), e pode modificar a influência da bupiriona sobre a liberação de glicocorticóides. Desta forma, diminuindo o efeito destes sobre a locomoção. Alterações na expressão do RNAm dos receptores 5-HT_{1A} e nos níveis de 5-HT, no início da vida, estão relacionadas a modificações no desenvolvimento e na atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Erdeljan, MacDonald e Matthews, 2001; Andrews et al., 2004). Sugerindo que mudanças os receptores 5-HT_{1A} desempenhem um papel na programação da função do eixo HPA (McNaughton, Panickar, Logan, 1996; Andrews et al., 2004). Entretanto, ainda não se sabe se esses efeitos são permanentes (Erdeljan, MacDonald e Matthews, 2001; Andrews et al.,

2004). Portanto, maiores estudos necessitam ser realizados para a confirmação desta possível “programação serotoninérgica” à administração aguda do fármaco, ocasionada pelo tratamento neonatal com bupirone.

Em resumo, a administração crônica de bupirone, em doses mais baixas, altera o desenvolvimento de parâmetros relacionados à imobilidade, no campo aberto. Em doses mais altas, altera a potência produzida, tardiamente, e programa a resposta à administração aguda de bupirone, em animais adulto-jovens. A administração aguda de bupirone reduz a atividade locomotora, no animal adulto-jovem.

5 Referências Bibliográficas

Andrews MH, Kostaki A, Setiawan E, McCabe L, Matthews SG. Developmental regulation of 5-HT_{1A} receptor mRNA in the fetal limbic system: response to antenatal glucocorticoids. *Dev Brain Res.* 2004;149:39-44.

Angrini M, Leslie JC, Shepard RA. Effects of propranolol, bupirone, pCPA, reserpine and chlordiazepoxide on open-field behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998;59(2):387-97.

Antri M, Mouffle C, Orsal D, Barthe JY. 5-HT_{1A} receptors are involved in short- and long-term processes responsible for 5-HT-induced locomotor function recovery in chronic spinal rat. *Eur J Neurosci.* 2003;18(7):1963-72.

Auclair AL, Galinier A, Besnard J, Newman-Tancredi A, Depoortère R. Putative antipsychotics with pronounced agonism at serotonin 5-HT_{1A} and partial agonist activity at dopamine D2 receptors disrupt basal PPI of the startle reflex in rats. *Psychopharmacology.* 2007;193:45-54

Ballion B, Morin D, Viala, D. Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat. *Eur J Neurosci.* 2001;14(10):1727-38.

Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 1999;38:1083-152.

Barreto Medeiros JM, Cabral Filho JE, De Souza SL, Freitas Silva SR, Mendes Da Silva C, Deiró TC, Monteiro JM, Guedes RC, De Castro CM, Manhães De Castro R. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. *Nutr Neurosci.* 2002;5(3):211-4.

Blier P, Ward NM. Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry*. 2003;53:193-203.

Borella A, Bindra M, Whitaker-Azmitia PM. Role of 5-HT_{1A} in development of the neonatal rat brain: preliminary behavioral studies. *Neuropharmacology*. 1997;36(4-5): 445-50.

Bravo G, Ibarra A, Guizar-Sahagún G, Rojas G, Hong E. Indorenate improves motor function in rats with chronic spinal cord injury. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007;100(1):67-70.

Carli M, Prontera C, Samanin R. Effect of 5-HT_{1A} agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: evidence that this model identifies anxiolytic-like activity. *Neuropharmacology*. 1989;28(5):471-6.

Cazalets Jr, Sqalli-Houssaini Y, Clarac F. Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *J Physiol*. 1992;455:187-204.

Clarac F, Vinay L, Cazalets JR, Fady JC, Jamon M. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Res Brain Res Rev*. 1998;28(1-2):35-43.

Collinson N, Dawson GR. On the elevated plus-maze the anxiolytic-like effects of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, but not the anxiogenic-like effects of the 5-HT_{1A} partial agonist, buspirone, are blocked by the 5-HT_{1A} antagonist, WAY 100635. *Psychopharmacology*. 1997;132:35-43.

Deiró TC, Manhães-de-Castro R, Cabral-Filho JE, Barreto-Medeiros JM, Souza SL, Marinho SM, Castro FM, Toscano AE, Jesus-Deiró RA, Barros KM. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiol Behav*. 2006;87(2):338-44.

Erdeljan P, MacDonald JF, Matthews SG. Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor (GR) but not mineralocorticoid receptor (MR) mRNA levels in fetal mouse hippocampal neurons, in vitro. *Brain Res*. 2001;896:130-6.

Eskow KL, Gupta V, Alam S, Park JY, Bishop C. The partial 5-HT(1A) agonist buspirone reduces the expression and development of l-DOPA-induced dyskinesia in rats and improves l-DOPA efficacy. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007;87(3):306-14.

Evenden JL. The effect of 5-HT_{1A} receptor agonists on locomotor activity in the guinea-pig. *Br J Pharmacol*. 1994;112(3):861-6.

Gerin C, Teilhac J, Smith K, Privat, A. Motor activity induces release of serotonin in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci Let.* 2008;436:91-5.

Geyer MA. Serotonergic functions in arousal and motor activity. *Behav Brain Res.* 1996;73(1-2):31-5.

Gramsbergen A, Geisler HC, Taekema H, van Eykern LA. The activation of back muscles during locomotion in the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999;112(2):217-28.

Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 1992;60:5-20.

Halford JC, Blundell JE. The 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence. *Physiol Behav.* 1996;60(3):933-9.

Haller J, Leveleki C, Halász J, Baranyi J, Makara GB. The effect of glucocorticoids on the anxiolytic efficacy of buspirone. *Psychopharmacology (Berl).* 2001;157(4):388-94.

Iizuka M, Nishimaru H, Kudo N. Development of the spatial pattern of 5-HT-induced locomotor rhythm in the lumbar spinal cord of rat fetuses in vitro. *Neurosci Res.* 1998;31:107-11.

Imeri L, Gemma C, De Simoni MG, Opp MR, Mancina M. Hypothalamic serotonergic activity correlates better with brain temperature than with sleep-wake cycle and muscle tone in rats. *Neuroscience.* 1999;89(4):1241-6.

Jacobs BL, Fornal CA. Serotonin and motor activity. *Curr Opin Neurobiol.* 1997;7(6):820-5.

Jacobs BL, Fornal CA. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology.* 1999;21:9S-15S.

Lauder, J.M. Neurotransmitters as morphogens. *Prog Brain Res*, v. 73, p. 365-87, 1988.

Lim LW, Temel Y, Sesia T, Vlamings R, Visser-Vandewalle V, Steinbusch HW, Blokland A. Buspirone induced acute and chronic changes of neural activation in the periaqueductal gray of rats *Neuroscience.* 2008;155(1):164-73.

Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci.* 2008;27(6):1400-8.

Lucas, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991;156:38-50.

Majercsik E, Haller J, Leveleki C, Baranyi J, Halász J, Rodgers RJ. The effect of social factors on the anxiolytic efficacy of buspirone in male rats, male mice, and men. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003;27(8):1187-99.

Matheson GK, Knowles A, Guthrie D, Gage D, Weinzapfel D, Blackbourne J. Actions of serotonergic agents on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the rat. *Gen Pharmacol.* 1997;29(5):823-8.

McNaughton N, Panickar KS, Logan B. The pituitary-adrenal axis and the different behavioral effects of buspirone and chlordiazepoxide. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;54(1):51-6.

Myoga H, Nonaka S, Matsuyama K, Mori S. Postnatal development of locomotor movements in normal and para-chlorophenylalanine-treated newborn rats. *Neurosci Res.* 1995;21:211-21.

Nakayama K, Nishimaru H, Kudo N. Developmental changes in 5-hydroxytryptamine-induced rhythmic activity in the spinal cord of rat fetuses in vitro. *Neurosci Lett.* 2001;307:1-4.

Nicolas LB, Klein S, Prinssen EP. Defensive-like behaviors induced by ultrasound: further pharmacological characterization in Lister-hooded rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2007;194(2):243-52.

Nishio H, Kasuga S, Ushijima M, Harada Y. Prenatal stress and postnatal development of neonatal rats — sex-dependent effects on emotional behavior and learning ability of neonatal rats. *Int. J. Devl. Neurosci.* 2001;19:37-45.

Pflieger J, Clarac F, Vinay, F. Postural modifications and neuronal excitability changes induced by a short-term serotonin depletion during neonatal development in the rat. *J Neurosci.* 2002;22(12):5108-17.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463:3-33.

Pruus K, Skrebuhhova-Malmros T, Rudissaar R, Matto V, Allikmets L. 5-HT_{1A} receptor agonists buspirone and gepirone attenuate apomorphine-induced aggressive behaviour in adult male Wistar rats. *J Physiol Pharmacol*. 2000;51:833-46.

Rajaofetra N, Sandillon F, Geffard M, Privat A. Pre- and postnatal ontogeny of serotonergic projections to the rat spinal cord. *J Neurosci Res*. 1989;22:305-21.

Riad M, Watkins KC, Doucet E, Hamon M, Descarries L. Agonist-induced internalization of serotonin-1A receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J Neurosci*. 2001;21(21):8378-86.

Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1988;31:959-62.

Tunnicliff G, Eison AS, Taylor DP (eds). *Buspirone Mechanisms and Clinical Aspects*. Academic press, San Diego, 1991.

Vinay L, Brocard F, Clarac F. Differential maturation of motoneurons innervating ankle flexor and extensor muscles in the neonatal rat. *Eur J Neurosci*. 2000;12:4562-66.

Wallis DI. 5-HT receptors involved in initiation or modulation of motor patterns: opportunities for drug development. *Trends Pharmacol Sci*. 1994;15(8):288-92.

Walton KD, Lieberman D, Llinás A, Begin M, Llinás RR. Identification of a critical period for motor development in neonatal rats. *Neuroscience*. 1992;51(4):763-67.

Westerga J, Gramsbergen A. The development of locomotion in the rat. *Dev Brain Res*. 1990;57:163-74.

Wiśłowska-Stanek A, Zienowicz M, Lehner M, Taracha E, Bidziński A, Maciejak P, Skórzewska A, Szyndler J, Płaźnik A. Buspirone attenuates conditioned fear-induced c-Fos expression in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 2005;389(2):115-20.

Considerações Finais

5 Considerações finais

Este trabalho desenvolveu um novo sistema automático de análise da atividade locomotora em roedores. O novo sistema mostrou-se capaz de evidenciar as modificações na locomoção, decorrente do desenvolvimento das estruturas relacionadas a esta. A possibilidade da análise automática elimina vieses, devidos à interferência do avaliador, sobre o estudo do comportamento (Noldus, Spink, e Tegelenbosch, 2001; Dunne, O'Halloran, Kelly, 2007), permitindo boa reprodutibilidade e garantindo confiabilidade aos dados. Além disso, sua implantação requer baixo custo, podendo ser utilizado em laboratórios e pesquisas. Entretanto, alguns parâmetros comportamentais da atividade locomotora não puderam ser avaliados pelo modelo proposto. Isto nos levar a buscar o aprimoramento do sistema para a inclusão desses parâmetros.

A manipulação crônica com bupiriona alterou a evolução ponderal dos animais, em todas as doses utilizadas. Porém essas alterações foram circunscritas as últimas semanas do período de aleitamento. Este efeito já foi observado por outros trabalhos realizados no laboratório (Barros, 1999), corroborando com a hipótese que a 5-HT apresenta influência sobre a ingestão alimentar, o que pode alterar o ganho de peso (Halford e Blundell, 1996). Entretanto a ação da bupiriona sobre a ingestão alimentar parece variar a depender da dose e da duração do tratamento (Li e Luo, 1993; Barros, 1999).

No que concerne ao estudo da locomoção, a manipulação farmacológica com bupiriona apresentou alterações pontuais, e estas variaram em relação às doses utilizadas. Outro trabalho do grupo, que utilizou este fármaco, também encontrou respostas variáveis a depender da dose utilizada (Barros, 1999). A bupiriona é uma droga ansiolítica e apresenta algumas características peculiares (Carli, Prontera e Samanin, 1989). Atua em dois sistemas de neurotransmissores, serotoninérgico e dopaminérgico, no primeiro mais que no segundo (Lima *et al.*, 2002). No próprio sistema serotoninérgico, apresenta maior afinidade para os receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos, do que para os pós-sinápticos (Anderer, Saletu e Pasqual-Marqui, 2000).

Ao contrário do esperado, de forma geral, não foi observado diminuição da locomoção com o tratamento crônico. Apenas a utilização das doses mais baixas de bupiriona (2,5 e 5 mg/Kg) alterou o padrão de evolução da locomoção, no que diz respeito aos parâmetros de imobilidade no campo. Este achado parece estar relacionado com o efeito bifásico ou em forma de U do fármaco (McNaughton, Panickar, Logan, 1996; Wisłowska-Stanek *et al.*, 2005; Auclair *et al.*, 2007). E, redução nos valores de potência média, aos 60 dias, foi

observada em todas as doses utilizadas. Esta alteração está relacionada ao tipo de cálculo utilizado no estudo da potência, que integra os valores de massa corporal, velocidade média e tempo de parada. Apesar de separadamente não terem sido observadas diferenças nesses parâmetros, a junção das pequenas mudanças presentes, resultou na redução da potência. O tipo de avaliação utilizada não nos permite afirmar se essa redução está relacionada à diminuição na capacidade física desses animais, ou se representa, realmente, influência do comportamento sobre a potência. A relevância desta observação está no fato de que uma das vantagens do uso da buspirona sobre outros ansiolíticos (benzodiazepínicos) é a ausência de efeitos desta sobre a musculatura (Tunncliff, Eison e Taylor, 1991, *apud*, Tunncliff *et al.*, 1992).

A aplicação aguda de buspirona reduziu a locomoção, independente do tipo de tratamento a que o animal tenha sido submetido no período de aleitamento. Notavelmente, é observada redução na distância percorrida e aumento no tempo de imobilidade no campo. Redução da atividade locomotora, em decorrência da aplicação aguda de buspirona já foi observada em alguns trabalhos descritos na literatura (Angrini, Leslie e Shephard, 1997; Majercsik *et al.*, 2003; Nicolas, Klein e Prinssen, 2007; Lim *et al.*, 2008). Esta redução pode ser relacionada a um efeito sedativo da buspirona (Pruus *et al.*, 2000) e/ou ação na liberação de glicocorticóides (Matheson *et al.*, 1997). O primeiro parece ser mediado via antagonismo dos receptores D2 (Collinson e Dawson, 1997; Pruus *et al.*, 2000; Eskow *et al.*, 2007), e o segundo por uma ação no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Erdeljan, MacDonald e Matthews, 2001; Andrews *et al.*, 2004). Entretanto, considerando a metodologia empregada neste estudo, não temos como distinguir qual ação – sedativa ou liberação de glicocorticóide – foi responsável pela redução da locomoção.

Nos animais tratados com a dose mais alta de buspirona (10 mg/Kg), durante o aleitamento, a redução da distância percorrida foi menor quando comparada a apresentada pelos animais que receberam salina no mesmo período. Sugerindo a existência de “programação serotoninérgica” sobre os mecanismos de controle da locomoção. Esse tipo de achado já foi observado em outros trabalhos desenvolvidos pelo grupo, em relação ao comportamento alimentar (Da Silva, 2008). A manipulação neonatal crônica com buspirona pode ter alterado, de forma permanente, a responsividade dos receptores 5-HT_{1A} à estimulação farmacológica, e dessa forma, alterada a liberação de glicocorticóides promovida pelo fármaco (Matheson *et al.*, 1997; Haller *et al.*, 2001). Porém outros estudos são necessários para a confirmação desta hipótese.

5.1 Perspectivas

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, é possível delinear algumas perspectivas:

- Aprimorar o sistema de análise da locomoção, para permitir avaliação de alguns parâmetros relacionados ao seu componente comportamental;
- Estudar os efeitos de drogas que atuem nos níveis globais de serotonina sobre o desenvolvimento da locomoção e a possibilidade da “programação serotoninérgica”;
- Estudar, em diferentes intervalos de tempo, os efeitos da administração aguda de buspirona sobre a locomoção em animais adultos.

Referências Bibliográficas

Referências

- ANDERER, P.; SALETU, B.; PASCUAL-MARQUI, D. Effect of the 5-HT_{1A} partial agonist buspirone on regional brain electrical activity in man: a functional neuroimaging study using low-resolution electromagnetic tomography (LORETA). **Psych Res: Neuroim Sec**, v. 100, p. 81-96, 2000.
- ANDREWS, M.H.; KOSTAKI, A.; SETIAWAN, E.; McCABE, L.; MATTHEWS, S.G. Developmental regulation of 5-HT_{1A} receptor mRNA in the fetal limbic system: response to antenatal glucocorticoids. **Dev Brain Res**, v. 149, p. 39-44, 2004.
- ANGRINI, M.; LESLIE, J.C.; SHEPARD, R.A. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine and chlordiazepoxide on open-field behavior. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 59, n. 2, p. 387-97, 1998.
- ANTRI, M.; MOUFFLE, C.; ORSAL, D.; BARTHE, J.Y. 5-HT_{1A} receptors are involved in short- and long-term processes responsible for 5-HT-induced locomotor function recovery in chronic spinal rat. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 7, p. 1963-72, 2003.
- AUCLAIR, A.L.; GALINIER, A.; BESNARD, J.; NEWMAN-TANCREDI, A.; DEPOORTÈRE, R. Putative antipsychotics with pronounced agonism at serotonin 5-HT_{1A} and partial agonist activity at dopamine D2 receptors disrupt basal PPI of the startle reflex in rats. **Psychopharmacology**, v. 193, p. 45-54, 2007.
- BÂ, A.; SERI, B.V. Psychomotor functions in developing rats: ontogenetic approach to structure-function relationships. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 19, n. 3, p. 413-25, 1995.
- BALLION, B.; MORIN, D.; VIALA, D. Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat. **Eur J Neurosci**, v. 14, n. 10, p. 1727-38, 2001.
- BARNES, N.M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1083-1152, 1999.
- BARRETO-MEDEIROS, J.M.; CABRAL-FILHO, J.E.; DE SOUZA, S.L.; FREITAS-SILVA, S.R.; MENDES-DA-SILVA, C.; *et al.* Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. **Nutr Neurosci**, v. 5, p. 211-4, 2002.
- BARROS, K.M.F.T. Efeito da desnutrição neonatal e/ou do tratamento com agonista 5-HT_{1A} sobre o desenvolvimento sensório-motor e atividade exploratória em ratos. Dissertação

(Mestrado em Nutrição) - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 104 f, 1999.

BASSO, D.M.; FISHER, L.C.; ANDERSON, A.J.; JAKEMAN, L.B.; MCTIGUE, D.M.; *et al.* Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 5, p. 635-59, 2006.

BORELLA, A.; BINDRA, M.; WHITAKER-AZMITIA, P.M. Role of 5-HT_{1A} in development of the neonatal rat brain: preliminary behavioral studies. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 4-5, p. 445-50, 1997.

BRAVO, G.; IBARRA, A.; GUIZAR-SAHAGÚN, G.; ROJAS, G.; HONG, E. Indorenate improves motor function in rats with chronic spinal cord injury. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 100, n. 1, p. 67-70, 2007.

BROCARD, F.; VINAY, L.; CLARAC, F. Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. **Dev Brain Res**, v. 117, p. 81-9, 1999.

BUBENÍKOVÁ-VALESOVÁ, V.; VOTAVA, M.; PÁLENÍČEK, T.; HORÁČEK, J. The opposite effect of a low and a high dose of serotonin-1A agonist on behavior induced by MK-801. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 4, p. 1071-8, 2007.

CARLI, M.; PRONTERA, C.; SAMANIN, R. Effect of 5-HT_{1A} agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: evidence that this model identifies anxiolytic-like activity. **Neuropharmacology**, v. 28, n. 5, p. 471-6, 1989.

CAZALETS, J.R.; SQALLI-HOUSSAINI, Y.; CLARAC, F. Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. **J Physiol**, v. 455, p. 187-204, 1992.

CLARAC, F.; VINAY, L.; CAZALETS, J.R.; FADY, J.C.; JAMON, M. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 28, n. 1-2, p. 35-43, 1998.

COLLINSON, N.; DAWSON, G.R. On the elevated plus-maze the anxiolytic-like effects of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, but not the anxiogenic-like effects of the 5-HT_{1A} partial agonist, buspirone, are blocked by the 5-HT_{1A} antagonist, WAY 100635. **Psychopharmacology**, v. 132, p. 35-43, 1997.

DA SILVA, M.C. Manipulação nutricional e/ou serotoninérgica no período gestacional em ratos: estudo do comportamento alimentar dos filhotes. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 71 f, 2008.

DEIRÓ, T.C.B.J. Desenvolvimento somático e sensório-motor e padrão do consumo alimentar, em ratos: efeitos do tratamento com inibidor da recaptação da serotonina durante o período de crescimento rápido do encéfalo. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 131 f, 1998.

DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain. **Am J Dis Child**, v. 120, n. 1, p.411-5, 1970.

DUNNE, F.; O'HALLORAN, A.; KELLY, J.P. Development of a home cage locomotor tracking system capable of detecting the stimulant and sedative properties of drugs in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 31, n. 7, p. 1456-63, 2007.

ERDELJAN, P.; MacDONALD, J.F.; MATTHEWS, S.G. Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor (GR) but not mineralocorticoid receptor (MR) mRNA levels in fetal mouse hippocampal neurons, in vitro. **Brain Res**, v. 896, p. 130-6, 2001.

ESKOW, K.L.; GUPTA, V.; ALAM, S.; PARK, J.Y.; BISHOP, C. The partial 5-HT(1A) agonist bupirone reduces the expression and development of l-DOPA-induced dyskinesia in rats and improves l-DOPA efficacy. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 87, n. 3, p. 306-14, 2007.

EVENNEN, J.L. The effect of 5-HT1A receptor agonists on locomotor activity in the guinea-pig. **Br J Pharmacol**, v. 112, n. 3, p. 861-6, 1994.

FADY, J.C.; JAMON, M.; CLARAC, F. Early olfactory-induced rhythmic limb activity in the newborn rat. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 108, n. 1-2, p. 111-23, 1998.

FOX, W.M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Anim Behav**, v. 13, n. 2-3, p. 234-41, 1965.

GEISLER, H.C.; GRAMSBERGEN, A. Motor development after vestibular deprivation in rats. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, n. 4, p. 565-9, 1998.

GEISLER, H.C.; IJEMA-PAASSEN, J.; WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. Vestibular deprivation and the development of dendrite bundles in the rat. **Neural Plast**, v. 7, n. 3, p. 193-203, 2000.

GEISLER, H.C.; WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. The function of the long back muscles during postural development in the rat. **Behav Brain Res**, v. 80, n. 1-2, p. 211-5, 1996.

GERIN, C.; BECQUET, D.; PRIVAT, A. Direct evidence for the link between monoaminergic descending pathways and motor activity. I. A study with microdialysis probes implanted in the ventral funiculus of the spinal cord. **Brain Res**, v. 704, n. 2, p. 191-201, 1995.

GEYER, M.A. Serotonergic functions in arousal and motor activity. **Behav Brain Res**, v. 73, n. 1-2, p. 31-5, 1996.

GRAMSBERGEN, A. Posture and locomotion in the rat: independent or interdependent development? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, p. 547-53, 1998.

GRAMSBERGEN, A.; GEISLER, H.C.; TAEKEMA, H.; VAN EYKERN, L.A. The activation of back muscles during locomotion in the developing rat. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 112, n. 2, p. 217-28, 1999.

HALES, C.N.; BARKER, D.J.P. The thrifty phenotype hypothesis. **Br Med Bull**, v. 60, p. 5-20, 1992.

HALFORD, J.C.; BLUNDELL, J.E. The 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence. **Physiol Behav**, v. 60, n. 3, p. 933-9, 1996.

HALLER, J.; LEVELEKI, C.; HALÁSZ, J.; BARANYI, J.; MAKARA, G.B. The effect of glucocorticoids on the anxiolytic efficacy of buspirone. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 157, n. 4, p. 388-94, 2001.

HARADA, K.; AOTA, M.; INOUE, T.; MATSUDA, R.; MIHARA, T.; *et al.* Anxiolytic activity of a novel potent serotonin 5-HT_{2C} receptor antagonist FR260010: A comparison with diazepam and buspirone. **Eur J Pharmacol**, v. 553, p. 171-84, 2006.

IIZUKA, M.; NISHIMARU, H.; KUDO, N. Development of the spatial pattern of 5-HT-induced locomotor rhythm in the lumbar spinal cord of rat fetuses in vitro. **Neurosci Res**, v. 31, p. 107-11, 1998.

IJKEMA-PAASSEN, J.; GRAMSBERGEN, A. Development of postural muscles and their innervation. **Neural Plast**, v. 12, n. 2-3, p. 141-51, 2005.

IMERI, L.; GEMMA, C.; DE SIMONI, M.G.; OPP, M.R.; MANCIA, M. Hypothalamic serotonergic activity correlates better with brain temperature than with sleep-wake cycle and muscle tone in rats. **Neuroscience**, v. 89, n. 4, p. 1241-6, 1999.

JACOBS, B.L.; FORNAL, C.A. Serotonin and motor activity. **Curr Opin Neurobiol**, v. 7, n. 6, p. 820-5, 1997.

JACOBS, B.L.; FORNAL, C.A. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 9S-15S, 1999.

JAMON, M.; CLARAC, F. Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. **Behav Neurosci**, v. 112, n. 5, p. 1218-28, 1998.

JAMON, M. The early development of motor control in neonate rat. **C. R. Palevol**, v. 5, p. 657-66, 2006.

JORDAN, L.M.; LIU, J.; HEDLUND, P.B.; AKAY, T.; PEARSON, K.G. Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. **Brain Res Rev**, v. 57, n. 1, p. 183-91, 2008.

KRAVITZ, E.A. Hormonal control of behavior: amines and the biasing of behavioral output in lobsters. **Science**, v. 25, p. 1775-81, 1988.

KULIKOV, A.V.; TIKHONOVA, M.A.; KULIKOV, V.A. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. **J Neurosci Met**, v. 170, p. 345-51, 2008.

LAUDER, J.M. Neurotransmitters as morphogens. **Prog Brain Res**, v. 73, p. 365-87, 1988.

LELARD, T.; JAMON, M.; GASC, J.P.; VIDAL, P.P. Postural development in rats. **Exp Neurol**, v. 202, n. 1, p. 112-24, 2006.

LI, E.T.; LUO, S. Buspirone-induced carbohydrate feeding is not influenced by route of administration and nutritional status. **Brain Res Bull**, v. 30, n. 5-6, p. 547-50, 1993.

LIM, L.W.; TEMEL, Y.; SESIA, T.; VLAMINGS, R.; VISSER-VANDEWALLE, V.; *et al.* Buspirone induced acute and chronic changes of neural activation in the periaqueductal gray of rats. **Neuroscience**, v. 155, n.1, p. 164-73, 2008.

LIMA, V.T.; MACEDO, D.S.; NOGUEIRA, C.R.; VASCONCELOS, S.M.; VIANA, G.S.; *et al.* Buspirone aumenta a densidade de receptores dopaminérgicos D2- símile em corpo estriado de rato. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 60, n. 1, p.38-40, 2002.

LOPES DE SOUZA, S.; OROZCO-SOLIS, R.; GRIT, I.; MANHÃES DE CASTRO, R.; BOLAÑOS-JIMÉNEZ, F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 6, p. 1400-8, 2008.

LOTSHAW, D.P.; LLOYD, P.E. Peptidergic and serotonergic facilitation of a neuromuscular synapse in *Aplysia*. **Brain Res**, v. 526, n. 1, p. 81-94, 1990.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v. 156, p. 38-50, 1991.

MAJERCSIK, E.; HALLER, J.; LEVELEKI, C.; BARANYI, J.; HALÁSZ, J.; *et al.* The effect of social factors on the anxiolytic efficacy of buspirone in male rats, male mice, and men. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 27, n. 8, p. 1187-99, 2003.

MANHAES-DE-CASTRO, R.; BARRETO-MEDEIROS, J.M.; MENDES-DA-SILVA, C.; FERREIRA, L.M.; GUEDES, R.C.; *et al.* Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 1, p. 121-4, 2001.

MARINHO, S.M.O.C. Efeito da manipulação neonatal do sistema serotoninérgico sobre o desenvolvimento do intestino delgado em ratos. 81f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

MATHESON, G.K.; KNOWLES, A.; GUTHRIE, D.; GAGE, D.; WEINZAPFEL, D.; *et al.* Actions of serotonergic agents on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the rat. **Gen Pharmacol**, v. 29, n. 5, p. 823-8, 1997.

McNAUGHTON, N.; PANICKAR, K.S.; LOGAN, B. The pituitary-adrenal axis and the different behavioral effects of buspirone and chlordiazepoxide. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 51-6, 1996.

MENDES-DA-SILVA, C.; DE SOUZA, S.L.; BARRETO-MEDEIROS, J.M.; DE FREITAS-SILVA, S.R.; ANTUNES, D.E.; *et al.* Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 60, n.4, p. 928-31, 2002.

MIGNON, L.; WOLF, W.A. Postsynaptic 5-HT(1A) receptors mediate an increase in locomotor activity in the monoamine-depleted rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 163, n. 1, p. 85-94, 2002.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 17, n. 1, p. 91-128, 1993.

MUIR, G.D. Early ontogeny of locomotor behaviour: a comparison between altricial and precocial animals. **Brain Res Bull**, v. 53, n. 5, p. 719-26, 2000.

MYOGA, H.; NONAKA, S.; MATSUYAMA, K.; MORI, S. Postnatal development of locomotor movements in normal and para-chlorophenylalanine-treated newborn rats. **Neurosci Res**, v. 21, p. 211-21, 1995.

NAKAYAMA, K.; NISHIMARU, H.; KUDO, N. Developmental changes in 5-hydroxytryptamine-induced rhythmic activity in the spinal cord of rat fetuses in vitro. **Neurosci Lett**, v. 307, p. 1-4, 2001.

NICOLAS, L.B.; KLEIN, S.; PRINSEN, E.P. Defensive-like behaviors induced by ultrasound: further pharmacological characterization in Lister-hooded rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 194, n. 2, p. 243-52, 2007.

NOLDUS, L.P.J.J.; SPINK, A.J.; TEGELENBOSCH, R.A.J. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behav Res Met Instr Comp**, v. 33, n. 3, p. 398-414, 2001.

O'NEILL, M.F.; SANGER, G.J. GR46611 potentiates 5-HT_{1A} receptor-mediated locomotor activity in the guinea pig. **Eur J Pharmacol**, v. 370, p. 85-92, 1999.

PEROUTKA, S.J.; SNYDER, S.H. Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol. **Mol Pharmacol**, v. 16, p. 687-99, 1979.

PFLIEGER, J.; CLARAC, F.; VINAY, F. Postural modifications and neuronal excitability changes induced by a short-term serotonin depletion during neonatal development in the rat. **J Neurosci**, v. 22, n. 12, p. 5108-17, 2002.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, p. 3-33, 2003.

PRUUS, K.; SKREBUHHOVA-MALMROS, T.; RUDISSAAR, R.; MATTO, V.; ALLIKMETS, L. 5-HT_{1A} receptor agonists buspirone and gepirone attenuate apomorphine-induced aggressive behaviour in adult male Wistar rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 51, p. 833-46, 2000.

RAJAOFETRA, N.; SANDILLON, F.; GEFFARD, M.; PRIVAT, A. Pre- and postnatal ontogeny of serotonergic projections to the rat spinal cord. **J Neurosci Res**, v. 22, p. 305-21, 1989.

REDROBE, J.P.; BOURIN, M. Dose-dependent influence of buspirone on the activities of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test. **Psychopharmacology**, v. 138, p. 198-206, 1998.

TANG, X.; YANG, L.; SANFORD, L.D. Individual variation in sleep and motor activity in rats. **Behav Brain Res**, v. 180, n. 1, p. 62-8, 2007.

TUNNICLIFF, G.; BROKAW, J.J.; HAUSZ, J.A.; MATHESON, G.K.; WHITE, G.W. Influence of repeated treatment with buspirone on central 5-hydroxytryptamine and dopamine synthesis. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 10, p. 991-5, 1992.

TUNNICLIFF, G.; EISON, A.S.; TAYLOR, D.P (eds). Buspirone Mechanisms and Clinical Aspects. Academic press, San Diego, 1991.

VINAY, L.; BROCARD, F.; CLARAC, F. Differential maturation of motoneurons innervating ankle flexor and extensor muscles in the neonatal rat. **Eur J Neurosci**, v. 12, p. 4562-6, 2000.

VINAY, L.; BROCARD, F.; CLARAC, F.; NORREEL, J.; PEARLSTEIN, E.; *et al.* Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. **Brain Res Rev**, v. 40, p. 118-29, 2002.

WALLIS, D.I. 5-HT receptors involved in initiation or modulation of motor patterns: opportunities for drug development. **Trends Pharmacol Sci**, v. 15, n. 8, p. 288-92, 1994.

WALTON, K.D.; LIEBERMAN, D.; LLINÁS, A.; BEGIN, M.; LLINÁS, R.R. Identification of a critical period for motor development in neonatal rats. **Neuroscience**, v. 51, n. 4, p. 763-7, 1992.

WALTON, K.D.; BENAVIDES, L.; SINGH, N.; HATOUM, N. Long-term effects of microgravity on the swimming behaviour of young rats. **J Physiol**, v. 565, p. 609-26, 2005a.

WALTON, K.D.; HARDING, S.; ANSHEL, D.; HARRIS, Y.T.; LLINÁS, R. The effects of microgravity on the development of surface righting in rats. **J Physiol**, v. 565, p. 593-608, 2005b.

WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. The development of locomotion in the rat. **Dev Brain Res**, v. 57, p. 163-74, 1990.

WISŁOWSKA-STANEK, A.; ZIENOWICZ, M.; LEHNER, M.; TARACHA, E.; BIDZIŃSKI, A.; *et al.* Buspirone attenuates conditioned fear-induced c-Fos expression in the rat hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 389, n. 2, p. 115-20, 2005.

Anexos

Anexo A – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 88/07

Recife, 04 de setembro de 2007

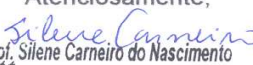
Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**
Departamento de Nutrição - UFPE
Processo nº 008864/2007-76

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado “**Tratamento neonatal com agonista 5-HT_{1A} : repercussões sobre o desenvolvimento da atividade locomotora em ratos normo ou hipernutridos**”.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Prof. Silene Carneiro do Nascimento
Presidente CEEA
